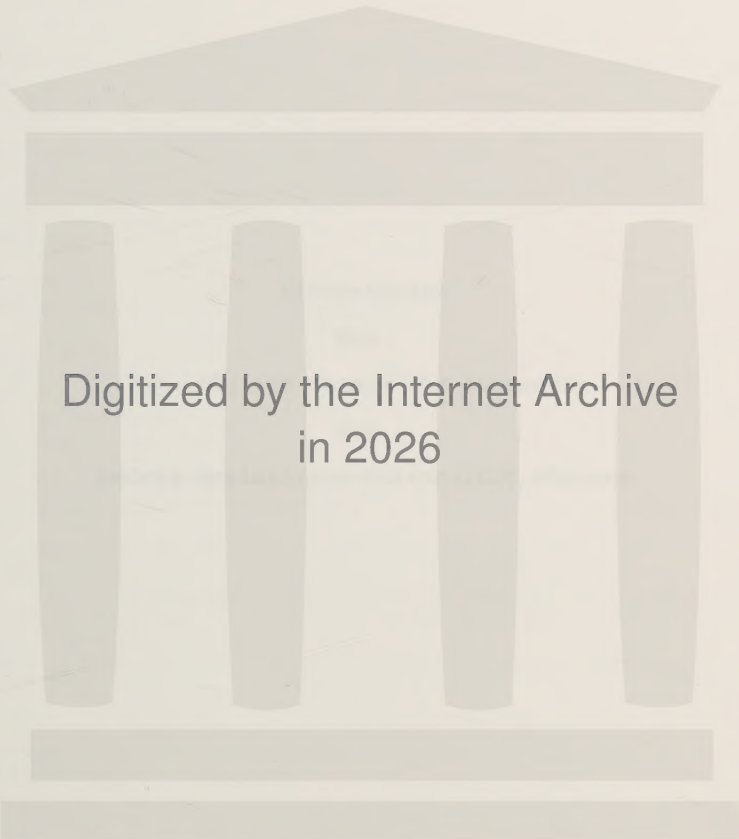


Die Retinal-Bindungstelle
in Bacteriorhodopsin,
untersucht mit Retinalanaloga

Elisabeth Kölling



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die Retinal-Bindungsstelle in Bacteriorhodopsin,
untersucht mit Retinalanaloga

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Elisabeth Kölling

München 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. 6. 1987

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	4
2.1 Sensorische und ionentranslozierende Retinalproteine	4
2.2 Retinal in Bacteriorhodopsin	7
2.3 Farbverschiebung	9
3. Ergebnisse	12
3.1 Aspekte der Retinalanalogsynthese	12
3.1.1 9,12-Phenylretinal	13
3.1.2 13-Azidoretinal	15
3.1.3 Acetylenische Retinale	16
3.1.4 5-Methoxyretinal	18
3.2 Purpurmbranen, Analog-Bacteriorhodopsine und Bestimmung der Protonentransportaktivität in Zellvesikeln	22
3.2.1 Purpurmbran, Weiße Membran, Apomembran	22
3.2.2 Rekonstitution von Bacteriorhodopsin aus Weißer Membran und aus Apomembran mit Retinal	23
3.2.3 Rekonstitution von Purpurmbran während des Wachstums von JW 5	25
3.2.4 Präparation von Zellvesikeln	26
3.2.5 Protonentransportaktivität	26
3.3 Bedeutung des Cyclohexenrings von Retinal für den Chromophor	27
3.3.1 Retinalanaloga ohne Cyclohexenring	29
3.3.2 Verändertes Substitutionsmuster am Cyclohexenring	33
a) Spiroretinal	33
b) 1,1,5-Tridesmethyl-2,3- <u>cis</u> -dimehtylretinal	36
c) 5-Ethylretinal	38
d) 5-Methoxyretinal	40
3.3.3 Acetylenische Retinalanaloga	51

3.4	Elektronenbeugung an Analog-Bacteriorhodopsinen	55
3.4.1	Drei Polyenal-BR in verschiedenen Präparationen	59
3.4.2	Umkristallisierung	61
3.4.3	Beurteilung der Kristallinität	61
3.4.4	Elektronenbeugung an PM und an <u>21</u> -BR	63
3.5	13-Azidoretinal in Bacterio-opsin	66
3.5.1	Rekonstitutionsverhalten und Photolyseversuche	67
	a) Inkubation mit WM bei Raumtemperatur	67
	b) Belichtungsexperimente	67
	c) Inhibitorverhalten	68
	d) Photolyseversuche	68
3.5.2	Fluoreszenz nach Reduktion mit Natriumborhydrid	69
3.6	Rotation am Kettenende während des Photozyklus, 9,12-Phenylretinal-Bacteriorhodopsin	71
3.6.1	Protonierte Schiffsche Base von 9,12-Phenylretinal mit Bacterio-opsin	72
3.6.2	13- <u>cis</u> -9,12-Phenylretinal rekonstituiert nicht mit Bacterio-opsin	74
3.6.3	Die Verhinderung des Photozyklus korreliert mit Inaktivität im Protonentransport	74
3.7	13-Desmethylretinalanaloga in Bacterio-opsin	77
3.7.1	13-dm-11,12-Didehydroretinal	78
3.7.2	13-dm-9,12-Phenylretinal	80
3.7.3	13- <u>cis</u> - und all- <u>trans</u> -Retinal-BR	82
3.8	Optische Spektroskopie an Purpurmbran und an Bacteriorhodopsin im pico- und femto-Sekundenbereich	84
3.8.1	Purpurmbranen	84
3.8.2	Bacteriorhodopsin-Trimere und -Monomere	86
4.	Diskussion	89

5. Material und Methoden	96
5. 1 Trienal <u>19</u> , Tetraenal <u>20</u> , Pentaenal <u>21</u>	98
5. 2 9,12-Phenylretinol	99
5. 3 9,12-Phenylretinal	100
5. 4 13-Desmethyl-9,12-phenylretinal	101
5. 5 13-Azidoretinal	102
5. 6 5-Methoxy- β -Ionon	103
5. 7 5-Methoxy- β -ionylidencarbonsäurenitril (5-Methoxy-C-15-nitril)	104
5. 8 5-Methoxy- β -ionyliden (5-Methoxy-C-15-Aldehyd)	105
5. 9 5-Methoxyretinsäurenitril	105
5.10 5-Methoxyretinal	106
5.11 Fermentation und Membranisolierung	107
5.12 Herstellung von Zellvesikeln	108
5.13 Apomembran	109
5.14 Rekonstitution von Bacteriorhodopsin und Analog- Bacteriorhodopsin	109
5.15 Messung der Protonentransportaktivität	110
5.16 Deuteriertes Bacteriorhodopsin	111
5.17 BR-Trimer	111
5.18 BR-Monomer	112
5.19 13-Azidoretinal als Inhibitor in der Bacterio-opsin-Bindungsstelle	112
5.20 Extraktionen der Bacteriorhodopsine	113
5.21 Proben für Röntgenbeugungsexperimente	114
5.22 Membranvergrößerung	114
Literatur	115
Abkürzungen	130

1. Zusammenfassung

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Aminosäuresequenz und bis zu einer Auflösung von 7 Å die Tertiärstruktur des protonentranslozierenden Membranproteins Bacteriorhodopsin von *Halobacterium halobium* bekannt. Um Mechanismen zur Auslösung des vektoriellen Transportes nach Lichtabsorption in Retinalproteinen zu untersuchen, wurden elektronisch und sterisch modifizierte Retinale als prothetische Gruppe in Bacterio-opsin (BO) eingesetzt.

Die ersten Schritte des Photozyklus von Bacteriorhodopsin (BR) wurden aufgeklärt.

1) Ein in der Retinalkette überbrücktes Retinalanalog, 9,12-Phenylretinal, wurde synthetisiert, drei cis-trans-Isomere durch HPLC isoliert und durch ^1H -NMR-Methoden zugeordnet. Es existiert in organischen Lösungsmitteln als all-trans- und nicht planares 13-cis-Isomer, wohingegen im entsprechenden 9,12-Phenylretinal-Bacteriorhodopsin nur das all-trans-Isomer als protonierte Schiff'sche Base vorliegt. Es wurde gezeigt, daß im all-trans-Photozyklus maximal Isomerisierungen an den Retinalbindungen 13, 14 und 15 beteiligt sind.

2) Die sterische Wechselwirkung der C-13-Methylgruppe von Retinal mit dem Protein wurde durch veränderte Kinetik der Rekonstitution von 13-Desmethylretinal-BR und die Kinetik

des Photozyklus erkennbar (1). Im Photozyklus von 13-Desmethyl-11,12-didehydroretinal-BR findet eine Verzweigung unter Bildung von all-trans-Retinalanalog und BO statt.

3) In Ergänzung zu früheren Arbeiten (2, 3) wurde eine hohe Spezifität für den Cyclohexenteil des Retinals in der BO-Bindungsstelle nachgewiesen.

4) Spiroretinal und BO bilden nur bei Ionenstärken über 3 M Analog-BR. 1,1,5-Tridesmethyl-2,3-cis-dimethylretinal-BR zeigte bei Zugabe von Natriumchlorid im Gegensatz zu normalem BR bathochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums. Die Proteinkonformation um den Cyclohexenbereich wird in Abhängigkeit von der Ionenstärke beeinflusst.

5) 5-Ethyl- und 5-Methoxyretinal-BR haben Absorptionsspektren mit sehr unterschiedlichen Maxima bei 505 und 570 nm. Bei hoher Natriumchloridkonzentration wird das Maximum der 5-Ethylretinal-BR-Absorption um 40 nm bathochrom verschoben. Die 6-s-Konformation, die durch Substitution am Cyclohexenring beeinflussbar ist, reguliert die Farbverschiebung.

6) Acetylenische Retinalanaloge rekonstituieren mit Bacterio-opsin zu Analog-Bacteriorhodopsinen und zeigen Protonentransportaktivität.

7) 5-Methoxyretinal wurde erstmals synthetisiert. Neben β -entsteht auch α -5-Methoxyretinal.

8) Ein Pentaenal-, Tetraenal- und Trienal-BR wurden durch drei verschiedene Methoden hergestellt. Präparate aus Pentaenal und in Anwesenheit von Hydroxylamin gebleichten Purpurmembranen (PM) zeigten bei Röntgenstrahlbeugung Diffraktionsbilder, die denen von PM am ähnlichsten waren. Die Membranen der Analog-BR-Proben wurden durch Inkubation mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und n-Octyl- β -D-glucopyranosid (OG) enthaltendem Puffer vergrößert, wobei wahrscheinlich auch Mikrokristallite zu Gunsten einer einheitlichen Kristallstruktur der Membran verschwinden. Die aus Elektronenbeugungsdaten gewonnenen Elektronendichtekarten von Pentaenal-BR weisen jedoch keine signifikanten Unterschiede zu PM auf, obwohl sich das Pentaenal um 10 Wasserstoff- und 5 Kohlenstoffatome von Retinal unterscheidet.

9) Die Bindungsstelle in Bacterio-opsin hat Spezifität für 13-Azidoretinal, was durch verlangsamte Rekonstitutionsraten von BR bei Anwesenheit dieses Analogs bewiesen wurde. Ein Chromophor mit Absorption von Grünlicht bildete sich jedoch nicht aus. Eine photochemische Quervernetzung von Position 13 aus an das Protein gelang nicht.

10) Durch Kurzzeitspektroskopie im femto-Sekunden- und pico-Sekundenbereich wurde das photochemische Verhalten des Chromophors in PM, BR-Trimer- und BR-Monomer-Proben untersucht. Erstmals konnten von M. C. Nuss, H.-J. Polland, A. Franz und W. Zinth in der Arbeitsgruppe von W. Kaiser, TU-München, die Bildung des ersten Photocyclusintermediates

J in 430 fs (4) und das daraus in 5 ps entstehende zweite Intermediat K (5) nachgewiesen werden. Ein Schema für die Potentialflächen des angeregten Zustandes von BR und der Grundzustände von BR, J und K wurde erstellt (4, 5).

2. Einleitung

2.1 Sensorische und ionentranslozierende Retinalproteine

Retinal, der Aldehyd von Vitamin A, ist die funktionelle Gruppe der lichtabsorbierenden Membranproteine zweier verschiedener biologischer Prozesse. Dies sind Informationsübertragungen in Signalketten und Energiewandlung durch Photosynthese. Lichtrezeptoren in den Augen von Vertebraten stehen am Anfang der Signalkette für das Sehen. Aber auch andere Sensorproteine vermitteln Informationen, und zwar für phototaktische, photophobische und photoattraktive Reaktionen. Bei der Photosynthese in grünen Pflanzen wird Licht durch Chlorophyll absorbiert und zur Wasserspaltung genutzt, um letztlich Kohlendioxid zu reduzieren und ATP zu synthetisieren. Die einfachste Art der Photosynthese geschieht jedoch in Retinalproteinen, wobei Ionen über die Zellmembran transportiert werden.

Die in konzentrierten Salzlösungen lebenden Archaeobakterien *Halobacterium halobium* enthalten in ihrer Membran sowohl Sensorproteine für photophobische und photoattraktive Reaktionen als auch ionentranslozierende Proteine. Die

Absorptions- und Aktionsspektren dieser Farbproteine haben Maxima zwischen 480 und 590 nm. Die Sensorproteine P_{480} und Sensorrhodopsin (SR) ergänzen sich durch photophobische Antwort im Blaulicht und photoattraktive Reaktion im Grünlicht. Dadurch sammeln sich die *H. halobium* - Zellen in Bereichen höherer Grünlichtintensität an, also bei maximaler Absorption der beiden ionentranslozierenden Proteine Halorhodopsin (HR) (6-9) und Bacteriorhodopsin (BR) (10, 11). Halorhodopsin transportiert Chlorid über die Membran von Außen nach Innen (12), sodaß die Chloridionenkonzentration im Innern der Zelle während des Wachstums aufrecht erhalten wird. Bacteriorhodopsin transportiert Protonen von Innen nach Außen. Der entstehende Protonengradient treibt die ATP-Synthese. Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin zusammen ermöglichen somit anaerobes Wachstum im Licht.

Um den Protonentransport in BR zu charakterisieren, wurden chemische (13), physikalische (11) und gentechnische (14, 15) Untersuchungen am Protein durchgeführt. Der Mechanismus im Protein kann jedoch nur aufgeklärt werden, wenn die Tertiärstruktur durch Röntgenbeugungsexperimente vollständig bekannt ist. In letzter Zeit wurde die Primärstruktur von HR bestimmt (16-18). Die Homologie zu BR beträgt 36 %, wobei insbesondere identische Positionen von aromatischen und sauren Aminosäuren und Aminosäuren im Bereich der kovalenten Retinalbindungsstelle gefunden wurden (18). In beiden Proteinen ist Retinal als protonierte Schiffische Base an Lysin gebunden. Beide Proteine durchlaufen Photozyklen innerhalb von 15 ms. Während das

Protein als Matrix bestimmte Retinalisomerisierungen kinetisch begünstigt und Ionenspezifität hat, wird der aktive Ionentransport durch die Photoreaktion der Retinal-Schiffischen Base ausgelöst. Reversible Isomerisierung führt im Sinne eines Schalters zum gerichteten Transport. Der Charakterisierung der Retinal-Protein-Wechselwirkungen kommt also besondere Bedeutung zu. Zum Verständnis der Bindungsstelle in BR ist es nützlich, sich Retinal komplementär zur näheren Proteinumgebung vorzustellen. Daraus ergeben sich zwei Ansätze zur Charakterisierung, nämlich erstens die Identifizierung der umgebenden Aminosäuren und zweitens die Modifizierung an Retinal. Für diese Arbeit wurde der zweite Ansatz gewählt.

Viele Retinalanaloga wurden bereits synthetisiert und in BR untersucht (1-3, 19-21). Die Auswahl von Analoga in der vorliegenden Arbeit erfolgte unter dem Gesichtspunkt, ionische und sterische Wechselwirkungen mit dem Protein, die für die Schalterfunktion von Bedeutung sind, zu charakterisieren.

Die in Zusammenarbeit mit anderen Gruppen durchgeführten Strukturuntersuchungen, Resonanz-Raman Messungen, optische Kurzzeitspektroskopien, chemische Synthesen und Modellrechnungen werden im Abschnitt Ergebnisse vorgestellt.

2.2 Retinal in Bacteriorhodopsin

Das an Lysin 216 in Bacteriorhodopsin gebundene Retinal (22-25) bildet zusammen mit den mit ihm sterisch und elektronisch wechselwirkenden Aminosäuren den Chromophor. Retinal besteht aus Cyclohexenteil und Kette mit zwei Abschnitten C-7 bis C-12 und C-13 bis zum Sauerstoff bzw. im Protein bis zum Stickstoff (Abb. 1).

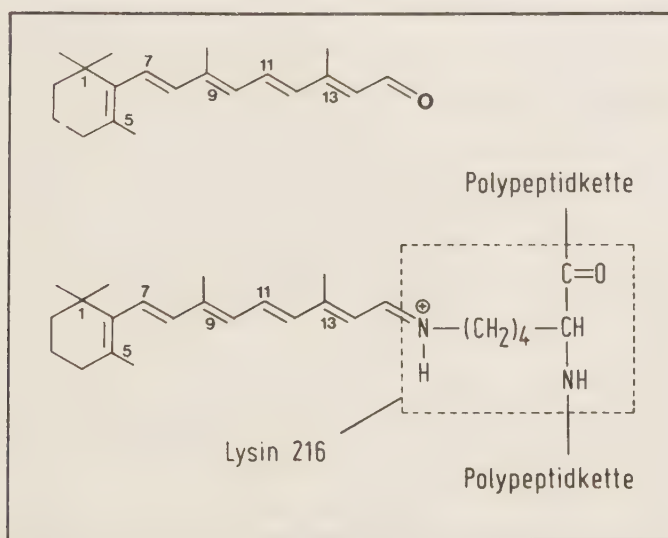


Abb. 1: Retinal 1. Unten: Protonierte Schiff'sche Base von Retinal mit Lysin 216 in Bacteriorhodopsin

Ohne Lichteinwirkung enthält BR zu gleichen Teilen (26) 13-cis, 15-syn-SBH⁺ und all-trans, 15-anti-SBH⁺ (27). Dieses dunkeladaptierte BR (BR_c und BR_t), das bei 558 nm maximal absorbiert, wird durch Belichtung quantitativ in eine lichtadaptierte Form (BR_t) überführt, die ausschließlich all-trans, 15-anti-SBH⁺ enthält. Dabei verschiebt sich das

Absorptionsmaximum nach 568 nm. Die Einstellung des thermischen Gleichgewichtes von BR_c und BR_t erfolgt innerhalb von 30 Minuten.

BR_t und BR_c mit den beiden Retinalkonfigurationen all-trans und 13-cis sind Edukte für Photozyklen (28, 26), jedoch führt nur der all-trans-Zyklus, bei dem reversible all-trans - 13-cis - Isomerisierung und Deprotonierung der Schiffischen Base stattfinden, zum Protonentransport. Es konnte noch nicht geklärt werden, welche thermischen Gleichgewichte zwischen Intermediaten beider Zyklen existieren. Im all-trans-Zyklus werden die spektral unterscheidbaren Intermediate J_{600} , K_{590} , L_{550} , M_{412} und O_{640} durchlaufen. Der Zerfall von M wurde als zweiphasig beschrieben und Verzweigungen bei L_{550} bzw. M_{412} postuliert (29-33).

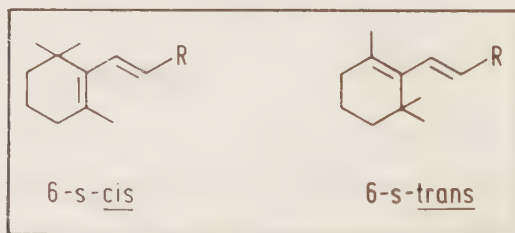


Abb. 2: 6-s-cis- und 6-s-trans-Konfiguration von Retinal. Das Kettenende ist durch R abgekürzt.

Die Einfachbindungen 8-s, 10-s, 12-s und 14-s liegen in BR s-trans vor, wobei leichte Torsionen nicht auszuschließen sind (34). Theoretische Überlegungen lassen trans-cis-Isome-

risierungen der 14-s-Bindung während des Photozyklus* vermuten (35, 36). Cyclohexenteil und Kette liegen in einer Ebene (37), und zwar nach neueren Interpretationen als 6-s-trans (38) (Abb. 2).

(* Wenn nicht gesondert erwähnt, ist im Folgenden immer der all-trans-Photozyklus gemeint.)

2.3 Farbverschiebung

Die Schiffische Base aus n-Butylamin und Retinal (n-Bu-RSB) hat in Isopropanol eine breitbandige Absorption mit Maximum bei 360 nm, das Absorptionsmaximum der n-BuRSBH⁺ (n-Bu-RSB, protoniert) liegt bei 440 nm. In lichtadaptiertem BR zeigt die protonierte Schiffische Base (SBH⁺) ein Absorptionsmaximum bei 568 nm (Tab 2a). Diese bathochrome Verschiebung gegenüber 440 nm beruht auf der durch das Protein veränderten Umgebung und wird Opsin-shift genannt (39, 40).

Die positive Ladung der protonierten Schiffischen Base wird stabilisiert durch Delokalisierung im konjugierten π -Elektronensystem und durch Gegenionen. Anordnung von Gegenionen und Delokalisierung sind voneinander abhängig. So wird die Delokalisierung um so größer, je weiter sich das Gegenion des protonierten Azomethins von der positiven Ladung entfernt oder je näher sich ein Anion in der Nähe des anderen Endes des Polyensystems befindet. Der pK-Wert der Schiffischen Base nimmt mit steigender Delokalisierung zu.

Ein konjugiertes Polyensystem weist Bindungsalternanz mit deutlicher Unterscheidung von Doppel- und Einfachbindung auf. Bei Protonierung am Stickstoff der Schiffischen Base, die zu stärkerer Delokalisierung im π -Elektronensystem führt, werden die Einfachbindungen kürzer und die Doppelbindungen länger. Wird nun das Anion von der Schiffischen Base fortbewegt, verkürzen sich die Einfachbindungen stärker und die Doppelbindungen werden noch länger (35).

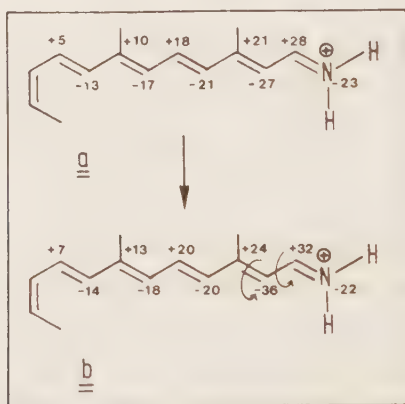


Abb. 3: Nach (35): (a) Partialladung von protonierten Schiffischen Basen im Grundzustand ohne Gegenion ($10^{-2} e$). (b) Durch 90° -Drehung der 13- und 14-s-Bindungen induzierte Verschiebung der Partialladungen als Modell für die Ladungsverteilung im angeregten Zustand ($10^{-2} e$). Die Partialladungen der Protonen ändern sich ebenfalls (nicht dargestellt).

Die Delokalisierungsverhältnisse eines Elektronensystems haben Auswirkungen auf das Absorptionsspektrum. Eine stärkere Delokalisierung geht einher mit einer bathochromen Verschiebung. Bei Verwendung von Anionen verschiedener Radien beobachteten bereits Blatz und Mohler in aprotischen Lösungsmitteln bathochrome Verschiebung mit steigendem

Anionenradius (41, 42). Kakitani et al. zeigten, daß die bathochrome Verschiebung im Protein auch mit den Bindungsverhältnissen korreliert. So nimmt die Frequenz der C=C-Streckschwingungen und damit der Doppelbindungscharakter mit steigender Wellenlänge ab (43).

Die bathochrome Verschiebung eines Absorptionsspektrums resultiert nicht nur aus Änderungen des Grund- sondern auch des angeregten Zustandes. SBH^+ zeigen bereits im Grundzustand eine starke Alternanz in der Ladungsverteilung entlang der Polyenkette (Abb. 3a, Modellrechnung Schulten, Tavan (35)). Diese alternierende Ladungsverteilung wird im angeregten Zustand, hier simuliert durch Drehung der 13- und 14-s-Bindung um 90° (Abb. 3b), noch verstärkt. Eine negative Ladung am Cyclohexen-Ende des π -Elektronensystems in der Nähe der C-Atome 5 bzw. 7 (40) stabilisiert den angeregten Zustand stärker als den Grundzustand. Durch Titrationsexperimente (44) wurde gezeigt, daß sich in der Nähe von Retinal eine zweite negative Ladung befindet.

Auch die Fixierung von Retinal hat Einfluß auf die Farbe. Bei Torsionen um Einfachbindungen wird Absorption bei kürzeren Wellenlängen erwartet (45). Die Planarisierung von Kette und Ring führt zu bathochromer Verschiebung der Absorption um ca. 2700 cm^{-1} (37, 46).

Zum Opsin-shift tragen also bei: (a) Der Abstand zwischen einer negativen Ladung im Protein und dem positiv geladenen Stickstoff des Lysins 216 der protonierten Schiffischen Base, (b) eine weitere negative Ladung und (c) die Planarisierung von Ring und Kette an der 6,7-Einfachbindung.

3. Ergebnisse

3.1 Aspekte der Retinalanalogsynthese

Einen großen Beitrag zur Synthese von Retinal leistete O. Isler mit seinem Konzept, Retinal im Baukastensystem aufzubauen (47). Er führte verschiedene C-C - Verknüpfungsmethoden in die Retinoidchemie ein, die ja durch die Einsetzbarkeit und Variierbarkeit der Wittig-Reaktionen (48) entscheidend erweitert wurden. Retinal kann, ausgehend von Cyclohexenonderivaten, durch Kombinationen von C-2 -, C-3 - und C-5 - Bausteinen synthetisiert werden. Für die Analogsynthese genügt es häufig, diese Bausteine zu variieren. Allerdings ist die Methode nicht universell anwendbar, da je nach eingeführtem Substituent Stabilität und Reaktivität des Synthesebausteins und darüber hinaus die thermische Stabilität und Reaktivität des entstehenden Retinalanalog gegenüber Sauerstoff und Säuren stark beeinflusst wird. Eine Übersicht über die heute üblichen Verfahren zur Retinalanalogsynthese wird von Frickl gegeben (49).

3.1.1 9,12-Phenylretinal

Das Retinal-Analog 2 (Abb. 4) (3-(4-(2-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexenyl)vinyl)phenyl)-2-butenal) wurde aus der Säure (50) durch Reduktion (LiAlH_4) / Oxidation (MnO_2) hergestellt und spektroskopisch ($^1\text{H-NMR}$, IR, MS, UV) charakterisiert. 2 kann als ein zwischen C-9 und C-12 überbrücktes, 10,11-s-cis-fixiertes Retinal angesehen werden, das als neues Strukturelement einen aromatischen Ring enthält (Numerierung der Atome wie bei Retinal (51)). Es wird 9,12-Phenylretinal genannt. Das all-trans-Isomer 2a ist in Lösung vorwiegend planar. Wie die Formelzeichnung (Abb. 4) andeutet, kann sich das 13-cis-Isomer 2b aufgrund sterischer Hinderung nur dann bilden, wenn gleichzeitig eine Drehung um die 12,13-Einfachbindung stattfindet.

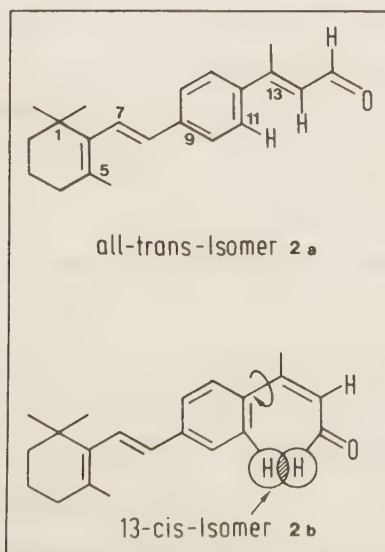


Abb. 4: 9,12-Phenylretinal 2. Das 13-cis-Isomer 2b liegt in einer um die 12,13-Einfachbindung gedrehten Konformation vor.

Bei Belichtung in Isopropylalkohol isomerisiert 2a zur 7-cis- und zur 13-cis-Verbindung 2b, die im photostationären Gleichgewicht (10 min Belichtung) im Verhältnis 20:13:67 vorliegen. Die Zuordnung gelang nach HPLC-Trennung durch 400 MHz- ^1H -NMR-Spektroskopie (Tab. 1). Das 7,13-dicis-Isomer konnte nicht nachgewiesen werden.

	13-Methyl	H ₇	H ₈	Aromat	H ₁₄	H ₁₅	Sonstiges
all-trans Phenylretinal	2,57	6,81 $^3J_{7,8}=16,4$ Hz	6,35	7,49	6,43 $^3J_{14,15}=7,9$ Hz	10,10	$^4J_{13\text{Me},14}=1,2$ Hz
7 - cis Phenylretinal	2,55	6,18 $^3J_{7,8}=12,5$ Hz	6,42	7,47	6,43 $^3J_{14,15}=7,9$ Hz	10,18	$^4J_{13\text{Me},14}=1,3$ Hz
13-cis Phenylretinal	2,32	6,77 $^3J_{7,8}=16,3$ Hz	6,37	7,27/7,44	6,13 $^3J_{14,15}=8,1$ Hz	9,54	$^4J_{13\text{Me},14}=1,4$ Hz
all-trans Retinal	2,32	6,33 $^3J_{7,8}=16,0$ Hz	6,15	-	5,96 $^3J_{14,15}=8,1$ Hz	10,09	$^4J_{13\text{Me},14}=1,2$ Hz

Tab. 1: ^1H -NMR-Daten (chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten) von den 9,12-Phenylretinalisomeren und von all-trans-Retinal in CDCl_3 mit TMS als Standard.

Die trans-Konfiguration der 13,14-Doppelbindung des 7-cis-Isomers wurde durch NOE-Experiment bestimmt. Die Einstrahlung bei der Wellenlänge der 13-Methylresonanz bewirkte Intensitätserhöhung des Aldehydsignals. Die durch den Ringstromeffekt resultierende Tieffeldverschiebung der 13-Methylprotonen (Tab. 1) im 7-cis- und im all-trans-Isomer 2a im Vergleich zur Verschiebung dieser Protonen in der 13-cis-Form 2b und in Retinal zeigt, daß der aromatische Ring und die Vinylgruppe mit der 13,14-Doppelbindung bevorzugt planar angeordnet sind. Da eine entsprechende Tieffeldverschiebung für das 13-cis-Isomer 2b nicht vorliegt, beweisen die NMR-Daten, daß dieses Isomer eine Konformation einnimmt, in der das Kettenende durch Drehung um die 12,13-Einfachbindung aus der Ebene des aromatischen Ringes herausragt. In der 13-cis-Verbindung 2b ergeben die Arylprotonen aufgrund der diamagnetischen Anisotropie der Carbonylfunktion ein AA'BB'-Spektrum; außerdem liegt das Signal des Aldehydprotons gegenüber dem des all-trans-Isomers 2a bei höherem Feld, was mit Literaturdaten für cis- und trans- β -Methylzimaldehyd übereinstimmt (52).

3.1.2 13-Azidoretinal

Ein α,β -ungesättigtes Azid läßt sich gut herstellen durch Addition von Jodazid an 2-Butennitril und anschließender basischer Eliminierung von Jodwasserstoff. Die Jodazidaddition an α,β -ungesättigte Nitrile oder Carboxylat-Ester verläuft regioselektiv, wobei Azid immer in die β -Position zur elektronenziehenden Gruppe dirigiert wird. Die

Azidogruppe behält jedoch ihren nucleophilen Charakter, sodaß eine Wittig-Horner Reaktion mit dem entsprechenden C-4-Phosphonat nicht gelingt. N. Krause (53) addierte Stickstoffwasserstoffsäure an 13-dm-13,14-Didehydroretinal (dm = desmethyl), wobei selektiv 13-Azidoretinal entstand.

Das Isomerengemisch konnte gut über HPLC gereinigt werden. Zwei Isomere wurden charakterisiert über 500 MHz-NMR, UV/Vis, MS. All-trans-13-Azidoretinal entstand nicht. Es wurden ausschließlich 9,13-dicis- und 13-cis-13-Azidoretinal isoliert, was durch NOE-Experimente nachgewiesen wurde. 13-cis-Azidoretinal liegt bevorzugt als 12-s-trans vor im Gegensatz zu 13-tert.-Butylretinal. Für letztere Verbindung konnte nachgewiesen werden, daß eine 12-s-cis-Konformation deutlich bevorzugt wird (54).

3.1.3 Acetylenische Retinale

Einige wichtige Schritte zur Synthese acetylenischer Retinale (53) sind im Syntheschema Abb. 5 zusammengefaßt. Ausgehend von 2-Ethynyl-1,3,3-trimethylcyclohexen 5, einem häufig verwendeten Ringbaustein in der Retinalsynthese, ist eine Kettenverlängerung gut möglich. Die sterische Hinderung durch die drei Methylgruppen, die bei Cyclocitral als Edukt erschwerend wirkt, fällt hier bereits fort. 5 wird aus 2,2,6-Trimethylcyclohexanon 3 durch Ethinylierung mit Natriumacetylenid und anschließender Wassereliminierung des entstehenden syn-Alkohols 4 mit Kupfersulfat hergestellt.

Der Aufbau der Polyenkette beginnt über die Reaktion des aus 5 mit Natriumamid gebildeten Metallacetylid mit Essigsäureanhydrid. Alternativ entsteht 6 auch bei Reaktion des Grignard-Reagenzes aus 5 mit Ethylmagnesiumbromid und anschließender Umsetzung mit Essigsäurechlorid. Die Kette wird mit C-2- und C-5-Bausteinen durch Wittig-Horner-Reaktionen mit Phosphonato-nitrilen und anschließender Reaktion mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAH) verlängert (7,8,9).

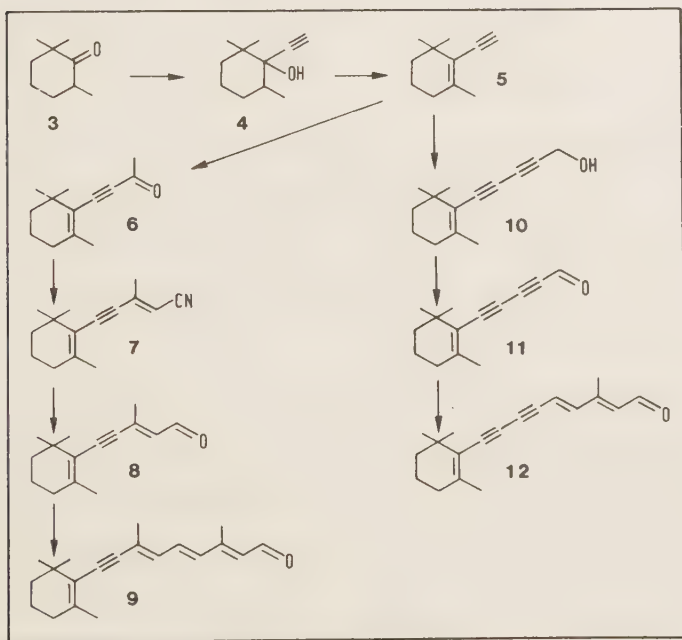


Abb. 5: Synthese von Acetylenischen Retinalanaloga

Diacetylene sind über die Reaktion von Metallacetyleniden mit Halogenalkinen zugänglich. So bildet 5 mit katalytischen Mengen an CuCl wahrscheinlich ein Metallat, welches dann mit 3-Brombut-2-inol zum Diacetylen 10 reagiert. Nach Oxidation von 10 mit Mangandioxid kann die Kette wie soeben beschrieben mit 3-Methyl-4-(diethylphosphonato)-crotonnitril (C-5-Baustein) verlängert und anschließend mit DIBAH zum Retinalanalog 12 reduziert werden.

3.1.4 5-Methoxyretinal

Als Schlüsselverbindung für die 5-Methoxyretinalsynthese wurde 3,3-Dimethyl-2-carbomethoxycyclohexanon 13 gewählt. Die Ketogruppe diente als Edukt für die Enoletherbildung, während nach Derivatisierung des Esters die Kettenbildung erfolgte (Abb. 6).

Bei der Reaktion von Ketonen mit Orthoameisensäuretrimethylester und katalytischen Mengen an p-Toluolsulfonsäure wird intermediär das Dimethoxyketal gebildet, aus dem in der Hitze Methanol unter Enoletherbildung abspaltet. Für 1-Methoxy-6-methyl-1-cyclohexen und 1-Methoxy-2-methyl-1-cyclohexen wurde ein thermodynamisches Gleichgewicht von 1,5 angegeben (55). Jedoch führte die Reaktion von 13 mit Orthoameisensäuretrimethylester ausschließlich zu 5,5-Dimethyl-1-methoxy-6-carbomethoxy-1-cyclohexen 14a. Auch unter basischen Bedingungen gelingt eine Isomerisierung zu 3,3-Dimethyl-1-methoxy-2-carbomethoxy-1-cyclohexen 14b nicht. Reduktion von 14a mit Lithiumaluminiumhydrid, das teilweise

durch Ethanol desaktiviert wurde, führt zu 6-Hydroxymethyl-5,5-dimethyl-1-methoxycyclohexen. Durch Oxidation des nicht aktivierten Alkohols mit Pyridiniumdichromat in Dichlormethan (56) entstand in einer Zweiphasenreaktion 5-Methoxy- α -cyclocitral 15 (57). Erst bei Behandlung mit Base, z.B. Chromatographie über eine Aluminiumoxidsäule, entstand quantitativ 5-Methoxy- β -cyclocitral.

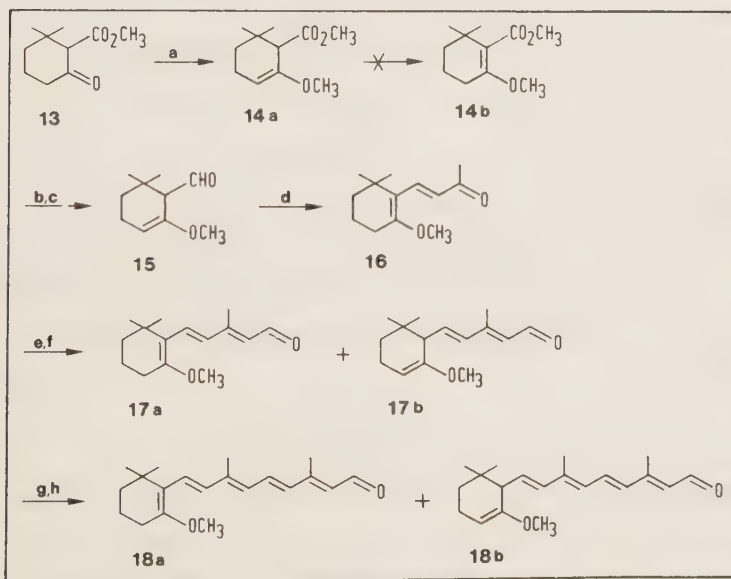


Abb. 6: Synthese von 5-Methoxyretinal.

Reaktionsbedingungen, (Ausbeuten).

a) $\text{HC}(\text{OCH}_3)_3$, *p*-Toluolsulfonsäure, Refl., (83%). b) LiAlH_4 , 0,2 äquiv.

Ethanol, Diethylether, Refl., (95%). c) $\text{PDC}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (35%).

d) Aceton, Kalium-*tert*.-butanolat, Toluol, 12 h, (17%).

e) $\text{PO}(\text{OEt})_2/\text{CH}_2\text{CN}$, NaH, THF, (36%). h) wie f), (70%).

Anschließende Aldolkondensation von 15 mit Aceton in Anwesenheit von Kalium-tert.-butanolat in Toluol liefert 5-Methoxy-C-13-Keton 16 als β -Isomer. Die weitere Kettenverlängerung wurde über Wittig-Horner Reaktionen mit Phosphonato-nitrilen und anschließender Reduktion mit Diisobutylaluminiumhydrid durchgeführt. In der Wittig-Horner Reaktion von 16 mit Diethylphosphonatoacetonitril entstand 5-Methoxy-C-15-nitril zu 66 % als all-trans- und zu 33 % als 9-cis-Isomer. Die Zuordnung erfolgte über ^1H -NMR-Spektren. Protonen 7 und 8 haben für beide Isomere die gleiche chemische Verschiebung. Die Hochfeldverschiebung von H-10 im 9-cisIsomer gegenüber all-trans resultiert aus der Anisotropie der CN-Gruppe. Die breiteren Signale für 9-Methyl und H-10 sprechen für die trans-Konfiguration, da hier die allylische Kopplung größer ist. In der HPLC-Analyse hat das 9-cis-Isomer eine kürzere Retentionszeit als das all-trans.

Die Reduktion zum 5-Methoxy-C₁₅-aldehyd 17 mit DIBAH führte neben β - auch zum α -Isomeren (17b und 17a), α entstand bis zu ca. 25 %. Typisch für das α -Produkt im ^1H -NMR sind das pseudo-Triplet bei δ 4,73 für Proton 4 und zwei Signale für 1,1-Dimethyl.

Bei der Reaktion zu 5-Methoxy-retinsäurenitril entstanden α und β in etwa äquimolarem Verhältnis. Während der Reduktion wurde der Anteil an α -Isomer noch erhöht. Das isolierte Gemisch von α - und β -5-Methoxyretinal 18a und 18b isomerisierte nicht nach β . Die bei der Kettenverlängerung entstandenen Produkte erwiesen sich unter den Isolierungs-

bedingungen und auch bei tiefen Temperaturen unter Inertgasatmosphäre als labil, sodaß zwar das α -Isomer als reine Fraktion, aber β nur als Mischfraktion mit dem α -Isomer erhalten wurde.

Die 5-Methoxygruppe verändert die elektronischen Eigenschaften im Cyclohexenbereich und an den C-Atomen 7 und 8 in Retinal. Dadurch erscheinen die Protonen der 1,1-Dimethylgruppe und an C-7 und C-8 im Vergleich zu den Retinoiden bei tieferem Feld. Die im Vergleich zu Retinal leichte Bildung des α -Isomers verdeutlicht die Konkurrenz zwischen intramolekularen sterischen und elektronischen Wechselwirkungen in diesem Retinalanalog. Nur im β -Isomer konjugiert die Doppelbindung des Ringes mit der Polyenkette. Die sterische Wechselwirkung der 5-Methoxygruppe mit den Wasserstoffatomen an C-8 oder an C-7 sind aber größer als im α -Isomer, da im letzteren das C-Atom 6 als sp_3 -Zentrum vorliegt.

3.2 Purpurmembran, Analog-Bacteriorhodopsine und Bestimmung der Protonentransportaktivität in Zellvesikeln

3.2.1 Purpurmembran, Weiße Membran, Apomembran

Im Vergleich zu anderen *Halobacterium halobium* Stämmen produziert die Mutante S9 besonders viel Bacterio-opsin (BO). Die normalerweise in 20-25% Natriumchlorid-Lösung lebenden Halobakterien lysieren bereits bei Salzkonzentrationen unter 12%. Durch differentielle Zentrifugation des Lysats aus S9 wird die Purpurmembran (PM), bestehend aus Bacteriorhodopsin (BR) und Lipid, als reine Membranfraktion in einer scharfen Bande auf einem 30-50%igem Zuckergradienten erhalten (61). Die Qualität der Präparation wird über das Verhältnis der Absorptionen bei 280 nm (Maximum der Proteinabsorption) und bei 560 nm (Maximum der Chromophorabsorption) bestimmt. Dieses Verhältnis variiert von 1.5 bis 1.7. Die BO-Produktion in der Retinal-negativen *H. halobium* Mutante JW5 beträgt bei gleichen Wachstumsbedingungen etwa 20% der Produktion in S9. Durch Retinal oder Retinaloximgaben während des Wachstums steigt diese Produktion bis auf 80% an. Nach Rekonstitution der PM (vgl. 3.2.2) aus weißer Membran (WM) (die BO enthaltende Membranfraktion von JW5) und Retinal (58) beträgt das Verhältnis der Absorptionen bei 280 nm und 560 nm 2.4 - 3.0. Bisher wurde aus JW5 keine WM in der Reinheit dargestellt, wie sie bei der PM-Isolierung üblich ist. Die Ursachen für die Schwierigkeiten dieser

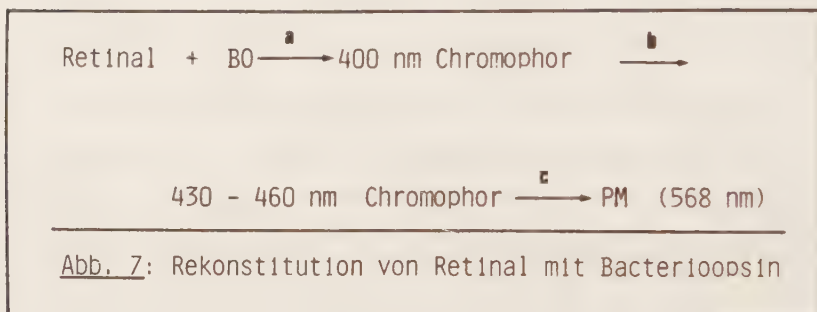
Aufarbeitung sind in der nicht kristallinen Tertiärstruktur von WM zu suchen (vgl. 3.2.3), woraus das heterogene Verhalten auf einem Zuckergradienten resultiert. Eine Weiterführung der Isolierung wäre über Säulenchromatographie möglich, jedoch müßten dann Detergentien zur Solubilisierung eingesetzt werden, deren Anwesenheit hier unerwünscht ist.

Als Apomembran (AM) werden Membranen bezeichnet, die aus PM durch Bleichung mit Hydroxylamin und Licht hergestellt werden (59). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Apomembranen wurde zusätzlich das entstehende Retinaloxim durch Licht ($\lambda > 320 \text{ nm}$) bis zu 95% zerstört (59). Nach anschließender Rekonstitution von PM (vgl. 3.2.2) mit AM und Retinal (58) beträgt das Verhältnis der Absorptionen bei 280 nm und 560 nm 2,0 bis 2,2. In der Apomembran kann noch bis zu 5% freies Retinal vorhanden sein, welches dann mit AM zur Purpurmembran rekonstituiert. Mit AM rekonstituierte Proben zeigen geringere Lichtstreuung als Proben mit WM.

3.2.2 Rekonstitution von Bacteriorhodopsin aus Weißer Membran und aus Apomembran mit Retinal

Bei Zugabe von Retinal zu Suspensionen von WM bzw. AM entsteht Bacteriorhodopsin unter Ausbildung einer protonierten Schiffschen Base (SBH^+) (58, 37) mit Lysin-216 (22-25). Bei Verwendung von Retinalanaloga für die Rekonstitution entsteht Retinalanalog-BR dann, wenn ebenfalls eine protonierte Schiffsche Base mit Lysin-216 ausgebildet wird.

Die Rekonstitution von BR aus Retinal und BO wird durch die Chromophorbildung spektral verfolgt und in drei Schritte (a bis c) eingeteilt (37) (Abb. 7).



Bei 0° C bildet sich schneller als in 1 Sekunde (a) ein Chromophor mit einem Absorptionsmaximum von 400 nm aus, der in wenigen Sekunden (b) zu einem längerwelligen Chromophor (Absorptionsmaximum 430-460 nm) reagiert. Erst im letzten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (b, $1/2$ h) reagiert Retinal mit Lysin-216 zur Schiffischen Base (60). Die Feinstruktur des Chromophors bei 430-460 nm zeigt an, daß bereits in dieser Vorstufe eine Hinderung der Rotation um die 6 - 7 Einfachbindung vorliegt.

Die Methoden zum Nachweis der Ausbildung einer protonierten Schiffischen Base sind im Folgenden aufgeführt:

1. Es bildet sich ein Chromophor aus, dessen Absorption gegenüber der protonierten n-Butylamin-Schiffischen Base (n-Bu-SBH⁺) in organischen Lösungsmitteln bathochrom verschoben ist.

2. Die Titration von WM bzw. AM mit Retinalanalog zeigt 1:1 Stöchiometrie der Chromophorbildung.
3. Reduktion mit Natriumborhydrid in der Bindungsstelle zum Retinyllysin ist möglich.
4. Der einzige direkte Nachweis erfolgt jedoch durch Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium und Messung der Resonanz-Raman Spektren. Die Resonanz der C=N - Streck-schwingung in der deuterierten Probe ist gegenüber PM um ca. 20 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen hin verschoben.

Methode 1 wurde dann als ausreichend zum Nachweis der Ausbildung einer protonierten Schiffschen Base angesehen, wenn zusätzlich in Zellvesikeln Protonentransportaktivität nachgewiesen wurde.

3.2.3 Rekonstitution von Purpurmembran während des Wachstums von JW5

Die BO-Biosynthese wird durch Retinal stimuliert (62-64). Erst die Rekonstitution von PM mit Retinal führt zu zweidimensional kristallinen Membranen. Es war bekannt, daß der Übergang von nichtkristallinen zu kristallinen Membranen beim Wachstum der Zellen begünstigt wird (64). Deshalb wurden Analoga 19, 20 und 21 (Tab. 2a) während des Wachstums von JW5 zugesetzt und anschließend Analog-BR isoliert.

3.2.4 Präparation von Zellvesikeln

Zur Messung der Protonentransportaktivität wurden Zellvesikel aus JW5 hergestellt. Die Präparation erfolgte nach (65) durch mehrmaliges Beschallen in 4 M NaCl. Der Proteingehalt beträgt durchschnittlich 47 mg per ml.

Das Rekonstitutionsverhalten von BR aus den Analoga und Bacterio-opsin hängt ab von der Salzkonzentration. Die Rekonstitutionsgeschwindigkeit ist i.A. schneller bei niedriger Salzkonzentration, jedoch findet in Einzelfällen (Spiroretinal-BR, vgl. 3.3.2) Rekonstitution erst bei höherer Salzkonzentration statt. Bei langsam rekonstituierenden Systemen wird in 2 M Salz gearbeitet, sonst in 4 M Salz. Wenn zur Rekonstitution ein cis/trans-Isomerengemisch des Analogs eingesetzt wird, kann durch selektive Belichtung (bis zu 5 min) im Absorptionsbereich des freien Retinals ein in zu geringer Menge vorhandenes cis-trans-Isomer neu erhalten werden. Dies reagiert dann mit BO.

3.2.5 Protonentransportaktivität

Die Messung der Protonentransportaktivität erfolgte in Zellvesikeln-Suspensionen (65) in Anwesenheit des lipophilen Kations Tetraphenylphosphonium (TPP^+). Unter diesen Bedingungen ist die Protonentransportgeschwindigkeit von der Geschwindigkeit der Protonenpumpe limitiert, da sich kein hemmendes Membranpotential aufbauen kann. In den Zellvesikeln werden wie in ganzen Zellen bei Belichtung

Protonen von Innen nach Außen transportiert, resultierend in einer Erniedrigung des pH-Wertes der Suspension (65). Die Protonentransportgeschwindigkeit wurde als Funktion der Lichtintensität gemessen und eine Sättigungskurve erhalten. Meßwerte aus dem linearen Bereich dieser Sättigungskurve für verschiedene Analog-BR wurden dann mit den entsprechenden Werten von BR verglichen, dessen Protonentransportaktivität als 100% definiert wurde.

3.3 Bedeutung des Cyclohexenrings von Retinal für den Chromophor

Kinetische Experimente zur Untersuchung der Substratspezifität der BO- und der Opsin-Bindungsstelle ergaben, daß BO im Vergleich zu Opsin keine Affinität zum Cyclohexenylring von Retinal hat. So binden Inhibitormoleküle mit kürzerer Kette als β -Ionylidenaldehyd (C-15-Aldehyd) nicht, wobei als Inhibitormoleküle Substanzen bezeichnet werden, die die Fähigkeit haben, die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen BO und all-trans-Retinal zu vermindern (2). In Inhibitorstudien mit Cyclocitral, 9-dm- β -Ionon, β -Ionon und längerkettigen Molekülen zeigen also erst Verbindungen ab C-15 und größer Affinität zur BO-Bindungsstelle, während die Opsin-Bindungsstelle bereits mit Cyclocitral reagiert (2).

Rekonstitutionsexperimente mit Retinalanaloga lassen diese geringe Affinität als Unspezifität erscheinen. So binden acetylenische Retinale nicht mit Opsin, aber mit BO

(3). 7,8-Didehydroretinale bilden zwar Chromophore mit BO, aber nicht mit Opsin (3). Rekonstitutionsversuche mit Trienalen, Tetraenalen und Pentaenalen, also Retinalanaloga ohne Ring oder mit fehlendem Ringschluß, führen zur Chromophorbildung mit BO, während Rhodopsine erst mit Pentaenalketten gebildet werden, deren Alkylsubstitution im Vergleich zu Retinal mindestens eine 16-, 17- oder 18-Methylgruppe aufweist (66).

Die Rekonstitution von PM aus Retinal und Bacterio-opsin verläuft in mindestens drei Schritten, wobei bereits im ersten Schritt a (siehe Abb. 7) wahrscheinlich eine sterische Fixierung von Ring und Kette erfolgt (37, 60). Noch deutlicher wird diese Fixierung durch die Feinstruktur im Spektrum des 430-460 nm Chromophors. Da mit Analoga, die den vollständigen Cyclohexenring, aber eine verkürzte Kette aufweisen, keine Schiffssche Base gebildet wird, ist mit diesen Analoga der zweite Schritt b geschwindigkeitsbestimmend bei der Reaktion mit BO. Für BO ist also nicht nur der Cyclohexenylring zur Substraterkennung notwendig, sondern auch ein Teil der Polyenkette, meßbar als Affinität in den Inhibitorstudien. Auf der anderen Seite gelingt Chromophorbildung zwar noch nicht mit 3-Methacrolein (C-5-Aldehyd) (67), jedoch mit Trienal 19 (s.u.); im Kettenbereich werden nur 10 C-Atome zur Erkennung benötigt. Mit Trienal 19 (Tab. 2a) wird eine Schiffssche Base gebildet, sodaß bei der Rekonstitution jetzt Schritt c die Geschwindigkeit der Reaktion bestimmt.

Es erhebt sich die Frage, ob für den Cyclohexenteil

trotzdem spezifische sterische Wechselwirkungen mit dem Protein vorliegen, die für den Chromophor und die Funktion von BR notwendig sind, die also über das Vorhandensein einer fünften Doppelbindung in Retinal hinaus unverzichtbar sind. Deshalb wurden die Chromophorbildung und die Protonentransportaktivität von Analoga untersucht, die entweder keinen Cyclohexenring haben oder am Cyclohexenring sterisch oder elektronisch modifiziert sind. In diese Untersuchungen wurden auch acetylenische Retinalanaloga aufgenommen, da sie durch Linearisierung in der Polyenkette die Lage des Cyclohexenringes im Protein verschieben können.

3.3.1 Retinalanaloga ohne Cyclohexenring

Zunächst wurden Enale untersucht, deren Doppelbindungssystem dem des Retinals entspricht bzw. ein bis zwei Doppelbindungen kürzer ist (Tab. 2a). Diese Analoga werden hier verkürzt Pentaenal 21 (3,7,11-Trimethyl-dodeca-2,4,6,8,10-pentaenal), Tetraenal 20 (3,7-Dimethyl-deca-2,4,6,8-tetraenal) und Trienal 19 (3,7-Dimethyl-octa-2,4,6-trienal) genannt. Tabelle 2a faßt die Absorptionsdaten dieser Aldehyde in Isopropanol, als $n\text{-Bu-SBH}^+$ und als BR-Analog zusammen.

Die Absorptionsspektren der BR-Analoga sind gegenüber BR blauverschoben (Abb. 8), die Bandenform ist jedoch ähnlich. Eine Titrationskurve von WM mit 20 (Abb. 9) zeigt deutlich, daß sich der Chromophor bei 445 nm in 1:1-Stöchiometrie ausbildet.

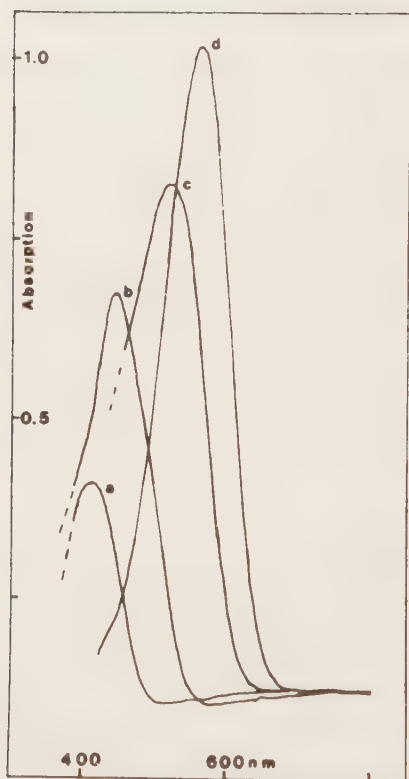


Abb. 8: Absorptionsspektren
von a) Trienal-BR, b) Tetraenal-BR,
c) Pentaenal-BR und d) BR.

Die Proben wurden in äquimolarem
Verhältnis rekonstituiert aus

19, 20, 21

bzw. Retinal und AM.

Mit Natriumborhydrid reagiert 20-BR bereits im Dunkeln vollständig unter Ausbleichen des Chromophors bei 0° C. 60% des Proteins können anschließend noch mit Retinal zu BR rekonstituiert werden. Weil Reduktion der Schiffschen Base mit Borhydrid zu einem Retinylprotein führt, blockiert der Retinylrest die Rekonstitution mit Retinal (37). Für die Reaktion von 20-BR mit Natriumborhydrid bedeutet dies, daß nur 40 % zu Retinylprotein umgesetzt wurden während 60 % durch konkurrierende Hydrolyse Tetraenol und BO bilden.

WM-Zellvesikel mit Pentaenal 21 zeigen 50 % Protonentransportaktivität, mit Tetraenal 20 nur noch 2-1% und mit Trienal 19 etwa 1% (Abb. 10).

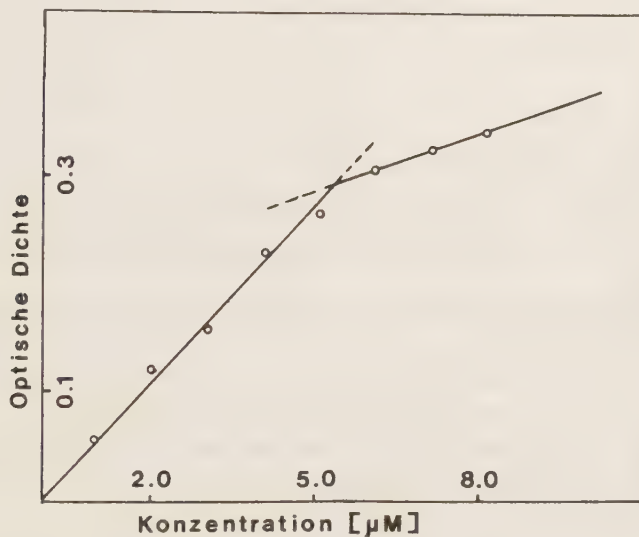


Abb. 9: Titrationskurve. Optische Dichten bei 445 nm von 5,2 μM WM-Suspensionen, die bei Raumtemperatur 15 min mit Tetraenal 20 inkubiert wurden.

Die Absorptionsdaten der drei Analog-BR, das am Beispiel von 20 beschriebene Rekonstitutionsverhalten, die Reaktion mit Natriumborhydrid und die Protonentransportaktivität dienen als Nachweis, daß jeweils mit BR vergleichbare Chromophore vorliegen.

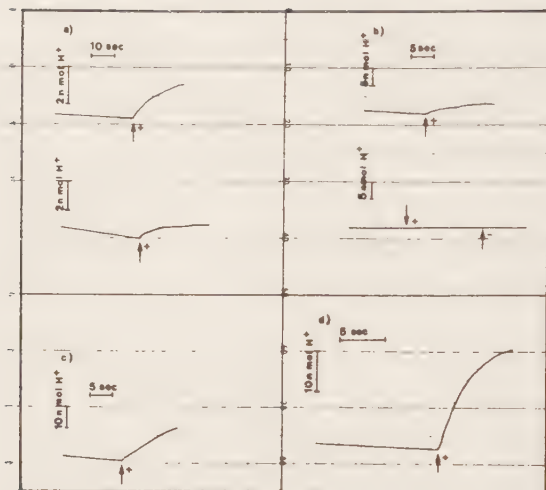


Abb. 10: pH-Änderung im Protonentranslokationsexperiment, gemessen an Zellvesikeln von JW 5, BO-Gehalt 10 nmol.

a) Oben: Vesikel mit Trienal 19. Darunter: Vesikel ohne Analog bzw. Retinal (der Anstieg beruht auf dem Lichtartefakt der in diesem Experiment verwendeten Elektrode).

b) Oben: Vesikel mit Tetraenal 20. Unten: Vesikel ohne Analog bzw. Retinal (Kontrolle für b bis d). c) Vesikel mit Pentaenal 21; d) Vesikel mit Retinal

Die Pfeile bezeichnen den Beginn (+) bzw. das Ende (-) der Belichtung.

Die Absorptionsmaxima von Trienal 19, Tetraenal 20 und Pentaenal 21 (siehe auch (66)) sollen zunächst mit denen von 7,8-Dihydroretinal 22 (68, 39), 5,6-Dihydroretinal 23 (69) (Tab. 2a) und 5-Desmethylretinal 24 (70), 1,1,5-Tridesmethylretinal (71) 25 (Tab. 2b) bzw. Retinal 1 (Tab. 2a) verglichen werden. Pentaenal 21 hat die gleiche Anzahl von Doppelbindungen wie 24, 25 bzw. Retinal, während das Doppelbindungssystem von Tetraenal mit 22 und von Trienal mit 23 vergleichbar ist. Bereits das Fehlen der 5-Methylgruppe (24) resultiert gegenüber BR in einer Blauverschiebung des Absorptionsspektrums um 18 nm, während das zusätzliche Fehlen der 1,1-Dimethylgruppen (25) nur noch Blauverschiebung um 5 nm bewirkt. Fehlt der Ring wie in 21,

so resultiert eine Blauverschiebung gegenüber 25 um weitere 25 nm. 20-BR und 19-BR erscheinen gegenüber den entsprechenden Dihydroanalog-BR ebenfalls um jeweils 25 nm blauverschoben. Der Opsin-shift ist am größten für das Pentaenal 21, nimmt ab für das Tetraenal 20 und wieder zu bei Trienal 19. Diese Daten entsprechen den für die Dihydroretinale gefundenen Opsin-shifts in B0.

Der Ring und die Methylsubstitution wirken also dirigierend für die spezifische Lage der Polyenkette im Protein. Bereits geringfügige Änderungen im Ringbereich führen zu einer drastischen Verminderung der Protonentransportaktivität.

3.3.2 Verändertes Substitutionsmuster am Cyclohexenring

Sterische und elektronische Änderungen am Cyclohexenring von Retinal sollten eine weitere Abschätzung über die Art der Wechselwirkung mit dem Protein erlauben. Dies wird in Untersuchungen an Spiroretinal 26 (72) und 1,1,5-Tridesmethyl-2,3-cis-dimethylretinal 27 (73) (Tab. 2b) dargestellt, außerdem an dem isosteren Paar 5-Methoxyretinal 18 und 5-Ethylretinal 28 (74) (Tab. 2b).

a) Spiroretinal

Der Cyclopropanring an C-1 von Spiroretinal 26 (Tab. 2b) hat einen geringeren Raumbedarf als die 1,1-Dimethylgruppe. Die beiden Methyl-C-Atome haben durch den Ringschluß einen um etwa $\frac{1}{3}$ geringeren Abstand gegenüber dem Abstand in

Retinal. Cyclopropane unterscheiden sich in ihren elektronischen Eigenschaften von Cycloalkanen ohne Ringspannung wie auch von Alkanen, da ihre C-C-Bindungen geringeren σ -Anteil besitzen als ungespannte C-C-Einfachbindungen und dafür π -Bindungscharakter vorhanden ist. In Spiroretinal kreuzkonjugiert also der Cyclopropanring mit der Polyenkette (75). Dies führt nicht zu bathochromer Verschiebung, da in kreuzkonjugierten Systemen die Absorption nur eines Chromophors (des längeren) zu beobachten ist.

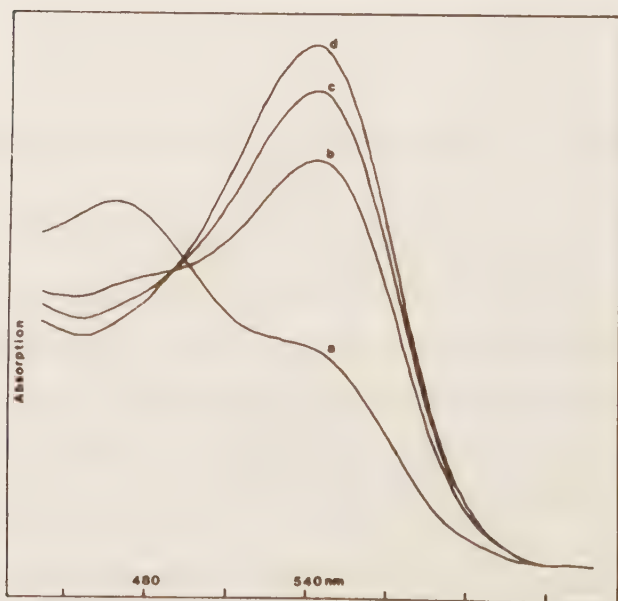


Abb. 11:

Spiroretinal, inkubiert mit WM in a) 1,0 M, b) 1,4 M, c) 2,0 M und d) 3,0 M NaCl

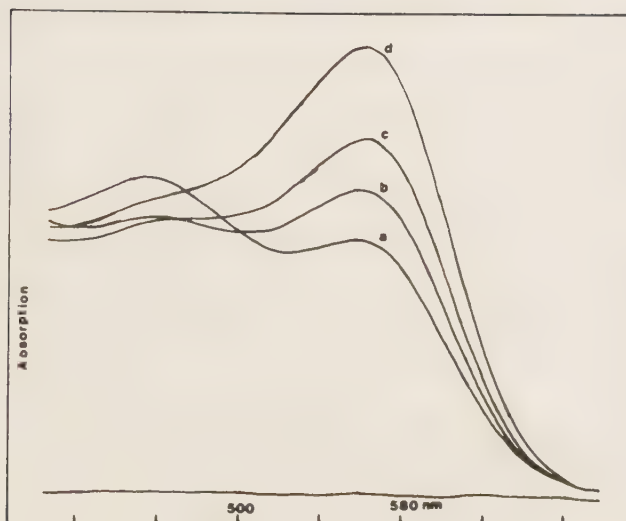


Abb. 12:

Spiroretinal, inkubiert mit WM in a) H_2O , b) 0,4 M, c) 0,8 M und d) 1,0 M $MgCl_2$

Überraschenderweise rekonstituiert Spiroretinal in wässrigen Lösungen nicht mit WM bzw. AM. Es tritt lediglich eine bathochrome Verschiebung nach 465 nm (keine Feinstruktur) mit einer Schulter bei 570 nm auf. Erst bei Zugabe von Salz ($NaCl$, Abb. 11 oder $MgCl_2$, Abb. 12) entsteht der Chromophor mit Absorptionsmaximum bei 570 nm.

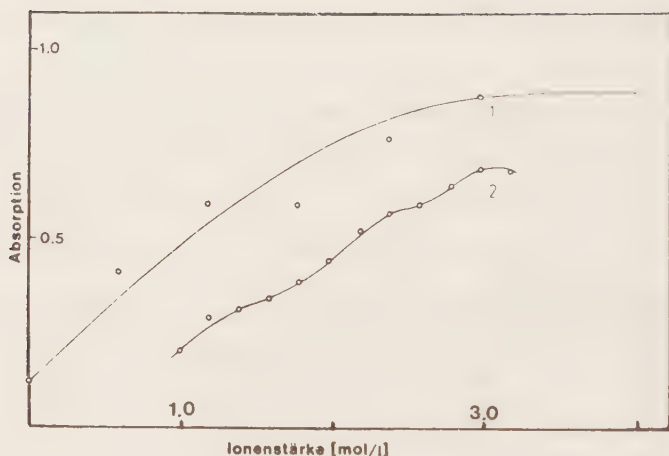


Abb. 13: Absorption von Spiroretinal-BR bei 570 nm (rel. Einheiten)

1) in Magnesiumchlorid, 2) in Natriumchlorid

Variation der Salzkonzentration, der Kationen und des pH führt zu folgenden Ergebnissen für die Chromophorbildung mit Maximum bei 570 nm:

Ab Ionenstärke 3 bildet sich der Chromophor vollständig aus (Abb. 13). Die Chromophorbildung ist reversibel, d.h. bei Dialyse entsteht wiederum das Maximum bei 465 nm. Durch Ansäuern kann die Chromophorbildung nicht induziert werden. Die Protonentransportaktivität, gemessen an Zellvesikeln in 4 M NaCl, beträgt 90% .

b) 1,1,5-Tridesmethyl-2,3-cis-dimethylretinal

Werden anstelle von 1,1,5-Tridesmethyl an C-2 und C-3 Methylgruppen in cis-Konfiguration substituiert (1,1,5-Tri-

desmethyl-2,3-cis-dimethylretinal 27) (73), entsteht ein Analog-BR mit Absorptionsmaximum bei 502 nm. Bei Erhöhung der Salzkonzentration bis 3.5 M Natriumchlorid verschiebt sich die Absorptionsbande bathochrom mit einem Maximum bei 526 nm (Tab. 2b). Die Absorptionsbanden der Analog-BR mit trans- und mit 13-cis-1,1,5-Tridesmethyl-2,3-cis-dimethylretinal 27 unterscheiden sich um 2 nm in wässrigen Analog-BR-Suspensionen und um 4 nm in 3.5 M NaCl-Lösungen. Die Protonentransportaktivität beträgt 25% (vgl. 5-Desmethylretinal-BR (25-BR): 64%).

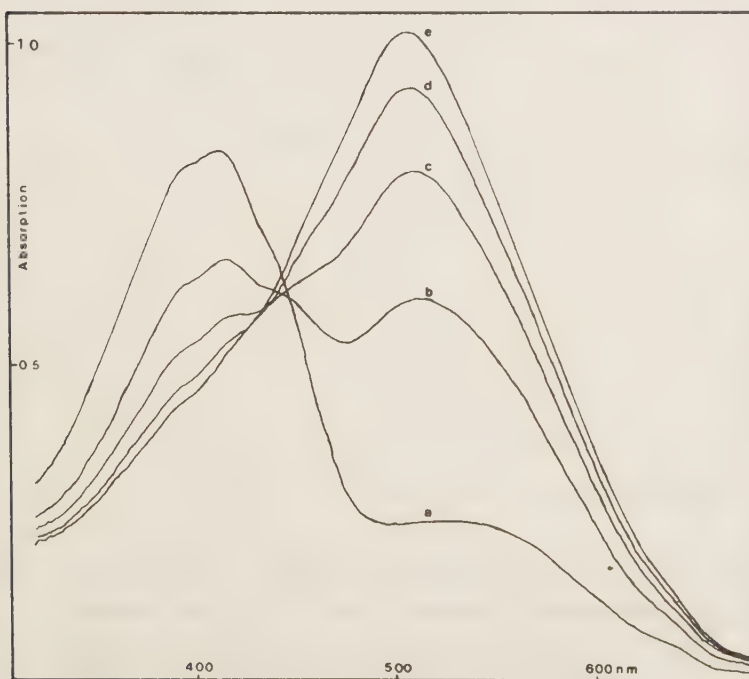


Abb. 14 a: 13-cis-5-Ethylretinal mit WM, nach a) 10 sec, b) 72 sec, c) 108 sec, d) 144 sec und e) 180 sec Inkubation.

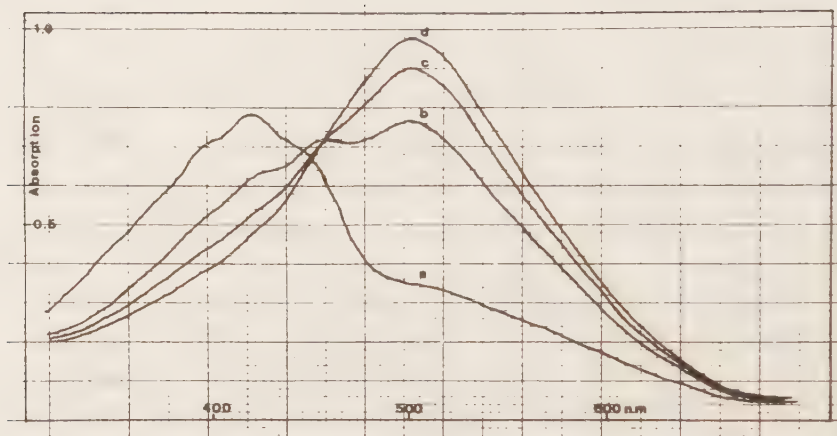


Abb. 14 b: *all-trans*-5-Ethylretinal mit WM, nach a) 10 sec, b) 72 sec, c) 108 sec, d) 144 sec Inkubation.

c) 5-Ethylretinal

All-trans- und 13-cis-5-Ethylretinal (74) wurden durch Trennung über HPLC isomerenrein isoliert. Während der Inkubation mit Bacterio-opsin (WM) wurden Absorptionsspektren zwischen 10 und 180 sec (Abb. 14,a) bzw. 144 sec (Abb. 14,b) aufgenommen. Bereits nach 10 sec entstand ein Intermediat mit Absorptionsmaximum bei 410 nm (Abb. 14,a) bzw. 420 nm (Abb. 14,b). Die Feinstruktur dieser Spektren

deutet auf bereits eingeschränkte konformative Freiheiten des 5-Ethylretinals hin (60). Die Bildungsgeschwindigkeiten der Endprodukte beider Isomere ($\lambda_{\text{max}} = 505 \text{ nm}$) betragen nur etwa ca. 1/3 (Abb. 14,a) bzw. ca. 2/3 (Abb. 14,b) der von Bacteriorhodopsin. All-trans-5-Ethylretinal reagiert schneller mit Bacterioopsin als 13-cis-5-Ethylretinal, während bei Retinal und den meisten bekannten Retinalanaloga das 13-cis-Isomer schneller reagiert.

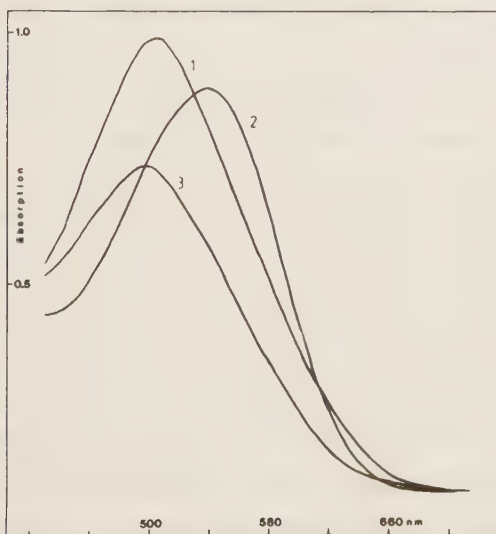


Abb. 15: Zwei Chromophore von 5-Ethylretinal-BR. 5-Ethylretinal bildet mit Bacterio-opsin in H_2O einen Chromophor mit maximaler Absorption bei 505 nm (1), mit Bacterio-opsin in 4 M NaCl mit maximaler Absorption bei 545 nm (2). Nach Dialyse gegen H_2O entsteht wieder 5-Ethylretinal-BR in H_2O mit maximaler Absorption bei 505 nm (3).

Die Absorptionsspektren von 5-Ethylretinal-BR in Wasser (Abb. 14,a und 14,b) fallen zu längeren Wellenlängen hin für einen Retinalchromophor ungewöhnlich flach ab und lassen ein Chromophorgemisch vermuten. In der Tat verschiebt Zugabe von Natriumchlorid (Endkonzentration 4 M) das Absorptionsmaximum des Chromophors nach 545 nm (Abb. 15). Entfernt man NaCl durch Dialyse, entsteht wiederum der Chromophor mit maximaler Absorption bei 504 nm.

Beide Chromophore zeigen Protonentransportaktivität, in beiden Fällen hat sich also eine protonierte Schiff'sche Base gebildet.

d) 5-Methoxyretinal

Die Absorptionsspektren von α -5-Methoxyretinal-BR (18a-BR) (Maximum 460 nm; vgl. α -Retinal-BR (29-BR), Maximum 492 nm, Tab 2c) und einem Gemisch aus α - und β -5-Methoxyretinal-BR sind in Abbildung 16 dargestellt. Das Differenzspektrum aus 1 und 2 mit einer Wichtung des Spektrums 2 durch den Faktor 0,4 (nicht dargestellt) zeigt das Spektrum von β -5-Methoxyretinal-BR mit Maximum bei 570 nm (Tab. 2b) und einer Schulter im kürzerwelligen Bereich.

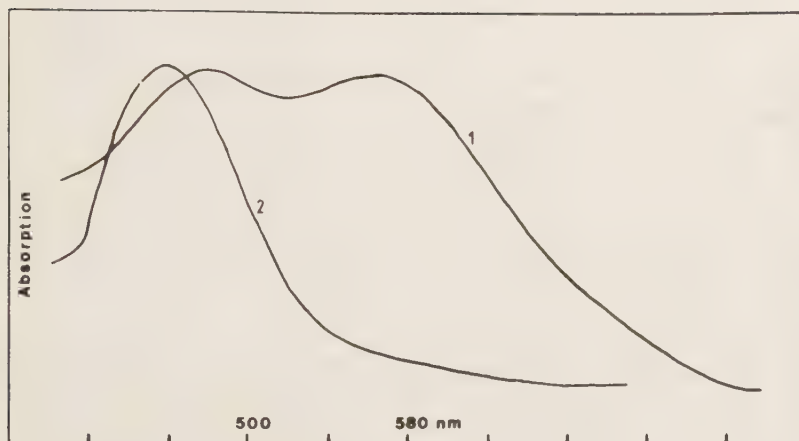


Abb. 16: Bacterio-opsin in H_2O wurde inkubiert mit einem Gemisch aus α - und β -5-Methoxyretinal (1). Spektrum 2 zeigt die Absorption von α -5-Methoxyretinal-BR mit Maximum bei 460 nm, das Absorptionsmaximum von β -5-Methoxyretinal-BR liegt bei 570 nm.

Eine Untersuchung in Abhängigkeit von Salzkonzentrationen konnte nicht durchgeführt werden. Aus der Isosterie zu 5-Ethyl folgt aber, daß β -5-Methoxyretinal in dem bei 570 nm maximal absorbierenden Chromophor eine der den 5-Ethylretinalkonformationen entsprechenden Lagen im Protein einnimmt.

Die Protonentransportaktivität konnte nicht genau bestimmt werden, da ein Gemisch von α - und β -5-Methoxyretinal vorlag. Sie liegt ungefähr bei 20 %.

Diskussion zu a) bis d)

Die Absorptionsdaten zu Spiroretinal 26, 1,1,5-Tridesmethy-
thyl-2,3-cis-dimethylretinal 27, 5-Ethylretinal 28 und
5-Methoxyretinal 18b sind in Tab. 2b zusammengefaßt. Obwohl
sich die Absorptionsbanden der Retinalanaloga in Isopropanol
kaum unterscheiden, variieren die Spektren der entsprechen-
den Analog-BR sehr stark. Drei Schlußfolgerungen lassen sich
daraus ziehen:

(i) Die maximale Farbverschiebung wird durch eine
Konformation des Proteins bewirkt, die nur in Salz
(Ionenstärke 3M) stabil ist. Salze beeinflussen das
Oberflächenpotential von Membranen, jedoch ist bei
Konzentrationen oberhalb der Ionenstärke 100 mM kein
Steigerung des Effektes mehr zu erwarten. Bei höheren
Ionenkonzentrationen kommen als zusätzliche Einflüsse
spezifische Ionenbindung oder Dehydratisierungseffekte
(Aussalzen) in Frage. Alle drei Parameter können die
Tertiärstruktur des Proteins beeinflussen. Dies hat
offensichtlich zur Folge, daß eine Cyclohexen-Bindungsstelle
für einige ringmodifizierte Analoga nur oberhalb einer
bestimmten Ionenstärke existiert.

(ii) Die Methylsubstitution sorgt für genaue Fixierung des
Cyclohexenringes am Ende des Polyensystems. In Abschnitt
3.3.1 wurde bereits erwähnt, wie bei Rekonstitutionen mit
5-Desmethyl- (24) und 1,1,5-Tridesmethylretinal (25)
Chromophore mit kürzerwelligen Absorptionsmaxima (550 nm und
545 nm) entstehen (Tab. 2b). Fehlen Substitutionen an C-1
bzw. C-5 wie bei 27, absorbiert das Analog-BR blauverschoben
gegenüber BR. Eine Regulation durch Salz (NaCl , MgCl_2), hier

beobachtbar als bathochrome Verschiebung um 24 nm, findet statt.

(iii) Der Cyclohexenring nimmt zwei (26-BR, 27-BR, 18b-BR) oder mehr Gleichgewichtskonformationen ein, die sich in ihren Absorptionsmaxima stark unterscheiden.

Die Annahme der planaren Konformation des Retinals in Bacteriorhodopsin bezüglich der 6,7-Einfachbindung basiert auf folgenden experimentellen Beobachtungen: Retinol erhält in der Bindungsstelle des Bacterio-opsins, und nur dort, die spektroskopischen Eigenschaften des Retroretinols und läßt sich photochemisch nur in der Bindungsstelle, nicht aber in freier Lösung im Retroretinol umwandeln (37). Diese Eigenschaft erhalten nur Moleküle, die außer dem Cyclohexenring auch noch die Seitenkette bis zum C-13 Atom des Retinals enthalten. Außerdem wird bei der Rekonstitution des Bacteriorhodopsins aus Retinal im ersten Schritt a (Abb.7) ohne kovalente Bindungsknüpfung mit dem Protein das Entstehen eines rot verschobenen Zwischenproduktes (BR_{400}) mit Feinstruktur beobachtet (37).

Ob die planare Konformation (Torsionswinkel um die 6,7-Einfachbindung = 0) eine s-cis oder s-trans Konformation ist, ist noch nicht mit Sicherheit entschieden. Retinanalogue Bacteriorhodopsine, in denen diese Stellung kovalent durch Einführen eines zweiten Ringes, der C-5 mit C-8 verknüpft, fixiert ist, bilden sich im Falle der trans-Verbindung leichter, sind aktiver und zeigen das Absorptionsspektrum des Bacteriorhodopsins, während die cis-Verbindung ein stärker rot verschobenes Absorptionsmaximum aufweist (38).

Dieser Effekt wird für homoannulare (cis) im Gegensatz zu heteroannularer trans-Verbindung erwartet, für offenkettige konjugierte Systeme, wie das Retinal selbst, jedoch theoretisch als sehr viel kleinerer Unterschied vorausgesagt (46). Zweifelsfrei ist jedoch, daß ein Abweichen der Winkelstellung von 0 in jedem Fall eine Blauverschiebung des Absorptionsmaximums gegenüber dem planaren Fall bewirken muß. Auf dieser Basis lassen sich die Daten zu den ringmodifizierten Analoga (Tabelle 2b) sinnvoll als Ausdruck verschiedener 6,7-Torsionswinkelstellungen interpretieren.

Ein Salzeffekt auf das Absorptionsmaximum wurde bisher weder für Bacteriorhodopsin noch eines seiner Analoga gefunden. 5-Ethylretinal-BR in 4M NaCl unterscheidet sich von 5-Ethylretinal-BR in H_2O um 40 nm. Planares 5-Ethylretinal ist besonders in der 6-s-cis-Form aber auch in der 6-s-trans-Form intramolekular sterisch stärker gehindert als die 6-s-Retinalkonformationen. Dies bedingt offensichtlich neben einer Konformation, die der des Retinals ähnlich ist, eine weitere Konformation im Protein.

Als isostere Verbindung zu 5-Ethylretinal ist 5-Methoxyretinal wohl auch derselben sterischen Abstoßung unterworfen. Die stärkeren elektronischen Wechselwirkungen und die durch die Donoreigenschaft der Methoxygruppe verstärkte Konjugation scheinen aber dazu zu führen, daß die planare Konformation, und damit das Absorptionsmaximum des Retinals, erhalten bleibt.

Die in Abhängigkeit von Salz modifizierte Chromophorbildung des Spiroretinal dürfte darauf zurückzuführen sein, daß

auch elektronische Wechselwirkungen mit dem π -Elektronensystem des Retinal im Cyclohexenbereich stattfinden und nur in Anwesenheit von Salz die 5,6-Doppelbindung und nicht der Cyclopropanring der Spiroverbindung für diese Wechselwirkung vom Protein erkannt wird.

Wichtig ist, daß die ringmodifizierten Analoga mit und ohne Salz Aktivität, wenn auch vermindert gegenüber Retinal, zeigen und damit belegen, daß die Stellung des Cyclohexenringes die Aktivität zwar quantitativ beeinflussen, aber nicht qualitativ ausschalten kann.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sterische und elektronische Wechselwirkungen des Cyclohexenringes mit der Proteinumgebung den Torsionswinkel um die 6,7-Bindung definieren. Er ist 0 in Retinal (ob trans oder cis ist noch unentschieden) und bei geeigneter Substitution z.B. mit einer Ethylgruppe in C-5 Stellung von 0 verschieden. Dann wird er als salzabhängig gefunden, wie die Beobachtung der verschiedenen Absorptionsmaxima zeigt. Dies ist als eine Kompetition von elektronischen und sterischen Wechselwirkungen des Retinals mit seiner Umgebung zu interpretieren. Der Torsionswinkel der 6,7-Bindung hat Einfluß auf die Aktivität der Protonenpumpe, aber nur in quantitativer Form.

Tabelle 2a:

Nr.	Aldehyd (nm)	SBH ⁺ (nm)	Bacterio- rhodopsin (nm)	Opsin- shift (cm ⁻¹)	A	Lit.
1		380	558	5120	100	
21		388	450	2991	50	
20		363	418	1701	2	
19		336	379	2289	1	
22		368	425	2500	aktiv 69,40	
23		342	392	2780	104	

Tabelle 2b:

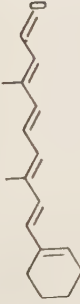
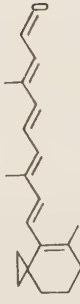
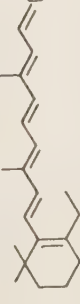
Nr.	Aldehyd (nm)	SBH ⁺ (nm)	Bacterio- rhodopsin (nm)	Opsin- shift (cm ⁻¹)	A (%)	Lit.
	388		540	550	65	1,70
			545			71
	380		465	(570)	90	
	390		502	(526)	34	
	378		505	(548)	31	
	384		570		aktiv	

Tabelle 2c:

Nr.

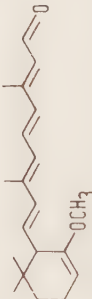
Nr.	Aldehyd (nm)	SBH ⁺ (nm)	Bacterio- rhodopsin (nm)	Opsin- shift (cm ⁻¹)	A (%)	Lit.	
18a		358	460				
29		370	431	484	2877	aktiv 20	
9		380		515	532	45 3	
30		352	405	510	5100	7	
31		365	410	525	535	5700	8
32				540	548		1

Tabelle 2d:

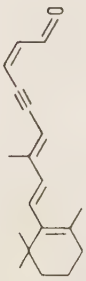
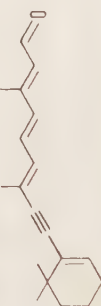
Nr.		Aldehyd (nm)	SBH ⁺ (nm)	Bacterio- rhodopsin (nm)	Opsin- shift (cm ⁻¹)	A Lit. (%)
12		350	380	485	5700	0,4
33				keine Rekonstitution		
34				keine Rekonstitution		
35		365	412	545	5900	6

Tabelle 2e:

Nr.		Aldehyd (nm)	SBH ⁺ (nm)	Bacterio- rhodopsin (nm)	Opsin- shift (cm ⁻¹)	A (%)	Lit.
36		375	418	510	4300	24	
37		377		500	518	24	3
38		374		504		7,5	3
39		355	405	465	3200	2	

Tabellen 2a-e: Absorptionsmaxima von Retinal und Retinalanalogen (Aldehyd), ihrer protonierten n-Butylamin Schiffischen Base (SBH⁺) und der Analog-BR (Bacteriorhodopsin). Aldehyd- und SBH⁺-Spektren wurden in Isopropanol aufgenommen. Bei den Bacteriorhodopsin-Daten (Spektren in H₂O) sind links die Maxima der dunkeladaptierten Form und rechts die Maxima der lichtadaptierten Form angegeben. Die Daten in Klammern () sind Absorptionsmaxima der Spektren in 4 M NaCl. Der Opsin-shift wurde berechnet aus der Differenz der Absorptionsmaxima der SBH⁺ und des längerwellig absorbierenden Bacteriorhodopsins. Die beiden letzten Spalten geben die Protonentransportaktivität (A) und Zitate (Lit.) an.

3.3.3 Acetylenische Retinalanaloga

Die Einführung einer Dreifachbindung anstelle einer Doppelbindung bewirkt eine elektronische und eine sterische Modifizierung im Vergleich zu Retinal. Eine Dreifachbindung hat stärkere elektrophile Eigenschaften als eine Doppelbindung. In konjugierten Systemen erfolgt eine hypsochrome Verschiebung im Absorptionsmaximum. Die Anordnung von vier bzw. sechs C-Atomen auf einer Verbindungslinie (Abb. 17) resultiert gegenüber Retinal entweder in einer Verschiebung des Cyclohexenrings um 1,5 Å bzw. 3 Å nach unten oder der Polyenkette nach oben.

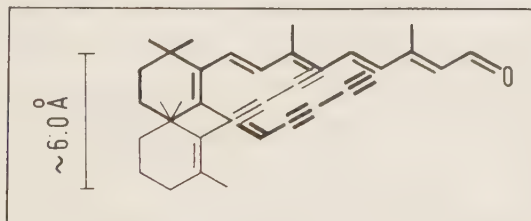


Abb. 17: Sterische Unterschiede von Retinal, 9-dm-7,8,10-Tridehydroretinal und 9-dm-10,11,12-Tridehydroretinal (siehe Text), dm = desmethyl

Eine Dreifachbindung wurde anstelle der Doppelbindungen 7,8 (9) (3), 9,10 (30) oder 11,12 (31) eingeführt (Tab. 2c). Weiterhin konnten Verbindungen mit zwei Dreifachbindungen, und zwar anstelle der Doppelbindungen 7,8 und 9,10 (12) oder 9,10 und 11,12 (33) synthetisiert werden (Tab. 2d).

Zusätzlich wurde das Methylsubstitutionsmuster verändert (Tab. 2), wodurch wiederum ein Vergleich nicht nur zu Retinal sondern auch zu verschiedenen Desmethylretinalen möglich wird.

In Tabellen 2c - 2e sind Maxima der Absorptionsspektren der Acetylenischen- und Diacetylenischen-Retinalanalog-BR aufgeführt. Für die Interpretation der Absorptionsdaten müssen folgende verschiedenen Einflüsse berücksichtigt werden:

- a) Die Molekülbereiche zu beiden Seiten der Dreifachbindung werden im Vergleich zu Retinal räumlich gegeneinander verschoben.
- b) Die Linearisierung von C-7 bis C-9 vermindert die sterische Hinderung zwischen Kette und Ringsubstituenten.
- c) Die Wechselwirkung des ungesättigten Systems mit einer internen Ladung ist verschieden im Vergleich zu Doppelbindungssystemen.

Die Einführung einer Dreifachbindung in 7,8- (9) bzw. 11,12-Position (31) bei Retinalanalog-BR führt zu Absorptionen mit Verschiebung gegenüber BR zu kürzeren Wellenlängen um etwa 35 nm. Der Effekt für 9-dm-10-Dehydroretinal-BR 30 (dm = desmethyl) und 9-dm-7,8-Didehydroretinal-BR 36 ist im Vergleich zu 9-dm-Retinal-BR 32 ebenso groß (38 nm). Das Retinalanalog-BR mit zwei Dreifachbindungen, und zwar in 7,8- und in 9,10-Position (12) des Retinals, absorbiert mit Maximum bei 485 nm, also zusätzlich um nochmals 25 nm blauverschoben im Vergleich zu 30 und 36.

Wie bei BR führen in 7,8-Didehydroretinal-BR Desmethylie-

rungen am Cyclohexenring (37, 38, Tab. 2e) zu Blauverschiebungen im Absorptionsspektrum. Diese betragen für die 5-dm-Verbindungen 18 (BR) bzw. 14 nm (7,8-Didehydroretinal-BR) und für die 1,1,5-Tridesmethylverbindungen 23 (BR) bzw. 28 nm (7,8-Didehydroretinal-BR). Während die zusätzliche Desmethylierung an Retinal nur einen geringen Effekt von 5 nm bewirkt, wird die Blauverschiebung für das 7,8-Didehydroderivat doppelt so groß. 1,1,5,9-Tetradesmethyl-7,8-didehydroretinal-BR absorbiert nur noch bei 465 nm. Als Interpretation bietet sich hier an, daß die Substitution an C-5 für die Ausbildung einer spezifischen 6-s-Konformation notwendig ist und die beiden 1,1-Dimethylgruppen eine geringe sterische Wechselwirkung mit dem Protein ausbilden. Jedoch sind für die 7,8-Didehydroverbindungen diese Wechselwirkungen mit der 1,1-Dimethylgruppe ausreichend groß, um den Cyclohexenring in einer Konformation zu halten, die der des 5-dm-Retinals entspricht. Fehlen die Methylgruppen an C-1 oder auch noch an C-9, so resultiert dies jedoch in starker Blauverschiebung des 7,8-Didehydroretinal-BR Chromophors.

Die Daten in Tab. 2d liefern Hinweise auf die all-trans-Konfiguration (Doppel- und Einfachbindungen) der Kette. Es ist bekannt, daß 9-cis-Retinal-BR nicht existiert. Betrachtet man den Raumbedarf von 9-dm-7,8,10-Tridehydroretinal 12, so nimmt er eine Stellung zwischen dem für Retinal und 9-cis,10-s-cis-Retinal ein. Mit diesem diacetylenischen Retinal 12 und WM rekonstituiert noch ein Analog-BR, obwohl bereits eine starke räumliche Verschiebung zwischen Cyclohexenring und Kettenende vorliegt (Abb. 17). Jedoch

gelingt Rekonstitution mit dem entsprechenden 1,1,5,9-Tetra-dm-7,8,10-Tridehydroretinal 34 nicht mehr. Mit 9-dm-10,11,12-Tridehydroretinal 33 erfolgt ebenfalls keine Rekonstitution obwohl Cyclohexenring und Kettenende in exakt die gleiche Position gebracht werden könnten wie bei 9-dm-7,8,10-Tridehydroretinal 12 (Abb. 17). Diese Ergebnisse zeigen, daß im Kettenbereich keine beliebige Konformationsfreiheit herrscht. In der Nähe des Cyclohexenrings ist eine Flexibilität zwischen Protein und Kette vorhanden (12-BR), die aber zum Kettenende hin abnimmt (kein 33-BR).

13-dm-11,12-Didehydroretinal 35 nimmt wie andere 13-dm-Retinale eine Sonderstellung ein, sodaß es gemeinsam mit diesen behandelt wird (Kap. 3.7).

3.4 Elektronenbeugung an Analog-Bacteriorhodopsinen

Purpurmembranen haben einen Durchmesser von durchschnittlich $0,5 \mu\text{m}$ (76). Sie sind in einem zweidimensionalen hexagonalen Gitter kristallisiert. Diese regelmäßige Struktur kann bereits auf Elektronenmikroskop-Bildern von *Halobacterium halobium* - Zellen, die in Gefrierätztechnik präpariert wurden, gesehen werden (77). Röntgenbeugungsdaten zeigen, daß die Dicke der Purpurmembranen $48 \text{ \AA}$ beträgt und die Einheitszellen eine Länge von $63 \text{ \AA}$ haben. Bei Beugung in Richtung der Membranebene wird der große α -Helixanteil sichtbar (78). CD-Daten weisen auf einen α -Helixanteil von 72-75 % hin und zeigen, daß Retinal einen Winkel von 23° zur Membranebene bildet (79-81). Retinal hat in der all-trans-Form eine Länge von ca. $15 \text{ \AA}$.

Mit Hilfe besonderer Elektronenbeugungstechnik bei sehr niedriger Strahlungsintensität (low dose imaging) (82, 83) wurden für drei Dimensionen Elektronendichtekarten bis zu $6 \text{ \AA}$ Auflösung erstellt und daraus sieben Bereiche mit hoher Elektronendichte lokalisiert (84, 85). Diese sieben Bereiche wurden α -Helices 1 bis 7 genannt. Die frei beweglichen hydrophilen Peptidreste, die die Helices verbinden, konnten nicht erkannt werden. Aufgrund der Primärstruktur von BR (86, 87) und der Analyse der hydrophoben/hydrophilen Peptidbereiche (88, 89) wurde eine begrenzte Anzahl von Modellen für die Anordnung der Aminosäuren in die hydrophoben α -Helix-Bereiche A bis G und die hydrophilen,

Helix verbindenden Peptide entwickelt. Es ist noch nicht möglich, den Strukturvorschlag auf ein Modell einzugrenzen (88).

Problematisch ist die Zuordnung der aus der Primärstruktur abgeleiteten Helices A bis G zu den Helices 1 bis 7 aus Strukturdaten und die Lokalisation des Retinals in der Struktur. King et al. (90) untersuchten mit Neutronenbeugung PM, die perdeuteriertes Retinal enthielt. Die Differenzbildung zu den Daten an PM ergab drei Bereiche mit erhöhter Elektronendichte, von denen ein Bereich als der wahrscheinliche für den Cyclohexenring von Retinal angesehen wurde. Dies ist in Abb. 18 durch den Bereich (a) angedeutet. Jubb et al. (91) verwendeten ebenfalls PM mit vollständig deuterierten Retinalen in Neutronenbeugungsexperimenten, während Seiff et al. (92) PM verwendeten, in der Retinal an C-7 bis C-15, C-19 und C-20 deuteriert war. Aus diesen Messungen resultierte die Lokalisation des Cyclohexenrings in Bereich (b) und der Kette in Bereich (c) (Abb. 18). Lysin 216 (Helix G der Primärstruktur) befindet sich danach in Helix 2 oder Helix 6 der Elektronendichtekarte, während sich das Retinal in Richtung der Helices 3 bis 5 orientiert. Die Helices A bis G würden, wenn Helix G mit 6 übereinstimmt, der Folge 6, 7, 1, 2, 3, 4, 5 entsprechen (Abb. 18). Bei dieser Zuordnung wurde zusätzlich angenommen, daß sich N- bzw. C-Terminus an Helix 5 bzw. 6 befinden.

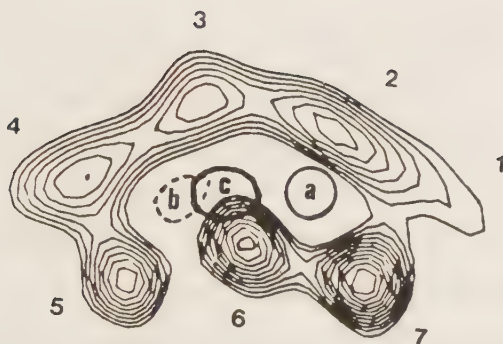


Abb. 18: Schematische Darstellung einer Elektronendichtekarte von BR aus Seiff et al. (92) mit Lokalisation des Cyclohexenbereichs von Retinal nach King et al. (90) (a), Jubb et al. (91) (b) und der Kette nach Seiff et al. (c)

Diese Interpretation lässt sich allerdings nicht mit dem Ergebnis aus dem biochemischen Experiment von Huang et al. (93) vereinbaren. Huang et al. verwendeten ein Retinalanalog, an dem sich anstelle des Cyclohexenrings ein Phenyl befindet und bei dem an der Position, die C-2 bzw. C-4 des Rings entspricht, ein Diazacyclopropen für Photoaffinitätsmarkierung substituiert ist. Nach Rekonstitution des entsprechenden Analog-BR wurden nach Belichtung enzymatische und chemische Proteinspaltungen durchgeführt und die

Peptidsequenzen mit den neu hergestellten kovalenten Bindungen zum Retinalanalog identifiziert. Daraus folgte, daß im Photolyseexperiment bevorzugt Reaktion mit Ser-193 und Glu-194 stattfand. Beide Aminosäuren befinden sich in Helix F, das entspricht nach der oben beschriebenen Zuordnung der Helix 7. Nach den Daten von Jubb und von Seiff hätte man eine bevorzugte Reaktion mit Aminosäuren der Helices 3, 4 oder 5 erwarten müssen.

Durch Elektronendiffraktion mit niedrigen Intensitäten und der Weiterentwicklung in der Datenaufbereitung könnte es gelingen, Strukturinformationen über das zweidimensional kristalline Membranprotein BR mit 3 Å Auflösung zu erhalten (84, 85). Es fehlten bisher Daten von isomorphen Kristallen, die zur besseren Phasenbestimmung notwendig sind (94). Möglichst werden Schweratomderivate des Proteins verwendet. Eine andere Möglichkeit zum isomorphen Ersatz besteht darin, kristallines Retinalanalog-BR zu verwenden. Hierbei sollte ein Retinalanalog gewählt werden, das eine möglichst große Massendifferenz zu Retinal aufweist und trotzdem noch gut kristallisiert. Es sollte möglich sein, die Position von Retinal direkt aus der Differenz zu den vorhandenen Daten von PM zu bestimmen und die Datensätze zu verfeinern. Im Folgenden wird dieser Ansatz beschrieben unter Verwendung von Retinalanaloga 19, 20 und 21.

3.4.1 Drei Polyenal-BR in verschiedenen Präparationen

Ziel der Präparation für die Elektronenbeugung ist es, gut kristalline Membranen ohne Mikrokristallite herzustellen mit einem Durchmesser von $> 1 \mu\text{m}$. Analog-BR wurde hergestellt durch

- a) Wachstum der Retinal-negativen Mutanten JW 5 bei Anwesenheit des Analogs und anschließender Isolierung von Analog-BR,
- b) Rekonstitution von Analog-BR aus Retinalanalog und WM,
- c) Rekonstitution von Analog-BR mit Retinalanalog und AM.

Die Fähigkeit von BR, kristalline Strukturen in der PM auszubilden, hängt neben dem Vorhandensein von Lipid auch von der Anwesenheit des Retinals ab. Die nicht kristalline AM ist durch Zugabe von Retinal und damit Rekonstitution von PM wieder kristallisierbar. Um den Weg über die nicht kristallinen, isolierten AM oder WM zu umgehen, wurden Retinalanaloga 21, 20 bzw. 19 und parallel dazu Retinal während des Wachstums von JW 5 inkorporiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie für die Isolierung von PM beschrieben (61). In Tab. 3 sind die Verhältnisse der Absorptionen bei 280 nm zu den Absorptionen im Maximum der Chromophore zusammengefaßt. Die Werte wurden unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten für Analog-BR korrigiert. Das Verhältnis beträgt für gereinigte PM aus S9 1.6. Der Anteil an nicht rekonstituiertem Protein wurde für Analog-BR größer.

Tabelle 3: Absorptionsverhältnis bei 280 nm (A_{280}) zum Maximum der Chromophorabsorption (A) für Purpurmembranen und Bacteriorhodopsine, isoliert aus S9 bzw. aus JW 5 - Zellen, die in Anwesenheit von Retinal(analog) fermentiert wurden. Die Extinktionen der Absorptionsmaxima der Analog-BR wurden auf die Extinktionen von PM bei 568 nm normiert.

	PM(S9)	PM(JW5)	19-BR	20-BR	21-BR
A_{280}/A	1,6	2,4	2,6	4,6	9,4

Analog-BR-Proben aus Rekonstitutionen mit Retinalanalog und WM zeigten ebenfalls ein hohes Verhältnis von Protein- zu Chromophorabsorption (2.6). Bei Rekonstitutionen von Analog-BR mit Apomembran wurden nach den Kriterien der Absorptionsspektroskopie die besten Membranfraktionen erhalten. Hier ist allerdings ein Rest an BR (< 5%) vorhanden.

3.4.2 Umkristallisieren

PM-Membranen sind nur selten homogen kristallin, es existieren meist zwei und mehr Mikrokristallite innerhalb der gleichen Membran. Durch Inkubation in einer Detergenzmischung aus Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und n-Octyl- β -D-glucopyranosid (OG) bei pH 5,2 werden Membranen bis zu 1,5 μ m Durchmesser erzeugt. Beste Vergrößerungsergebnisse wurden erzielt mit 0,1 μ M BR in 0,08 μ M CTAB und 0.2 % OG. Die Einheitlichkeit in der Kristallinität wird erst im Elektronenbeugungsbild sichtbar.

3.4.3 Beurteilung der Kristallinität

Zwischen den Zuständen gut kristallisierter PM und nicht kristalliner AM gibt es mehrere Zwischenstufen, die anhand von Röntgenbeugungsbildern beurteilt wurden. Die Beugungsmuster von PM waren bereits bis 7 Å indiziert und die Intensitäten densitometrisch bestimmt (78). Abb. 19 zeigt, daß Analog-BR Proben aus Retinalanalog und AM Beugungsmuster aufweisen. Zwischen 21-BR und 19-BR sind kaum Unterschiede erkennbar. Zum Vergleich ist in Abb. 19 auch das Beugungsmuster von AM dargestellt. Hier sieht man deutlich, daß man keine Reflexionen mehr zuordnen kann, diese Membran ist nicht kristallin. Die Analog-BR-Proben mit WM zeigten nur sehr verschwommene Ringe (keine Abb.).

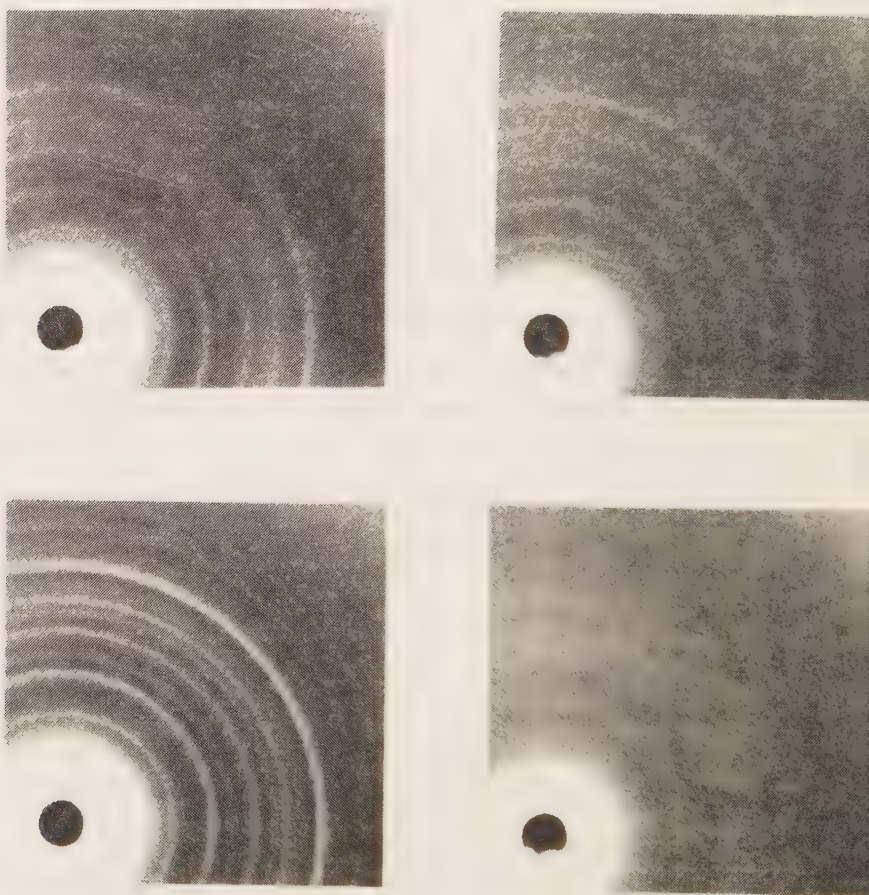


Abb. 19: Röntgendiffraktionsbilder von BR (unten links), 21-BR (oben links), 19-BR (oben rechts) und AM (unten rechts). Die BR-Proben wurden aus AM und Retinal(-analog) hergestellt.

3.4.4 Elektronenbeugung an PM und an 21-BR

Elektronenbeugungsexperimente an 21-BR und Berechnungen der Differenzkarten aus PM und 21-BR wurden von Tom Ceska im Labor von Richard Henderson durchgeführt. In Abb. 20 sind Elektronendichtekarten von PM (a) und 21-BR (b), letzteres aus einem einzelnen Diffraktionsbild, dargestellt. Die Tatsache, daß beide Bilder sehr verschieden voneinander sind, zeigt sofort, daß hauptsächlich statistische Signale auftauchen (noise). Eine quantitative Auswertung ergab, daß diese Fehler drei- bis viermal größer sind als man aus dem Unterschied von PM und 21-BR erwarten würde. Dies liegt einerseits an den normalen statistischen Unterschieden bei Messung der Beugungsintensitäten, aber auch an der mangelhaften Ordnung der 21-BR Moleküle in der Membran.

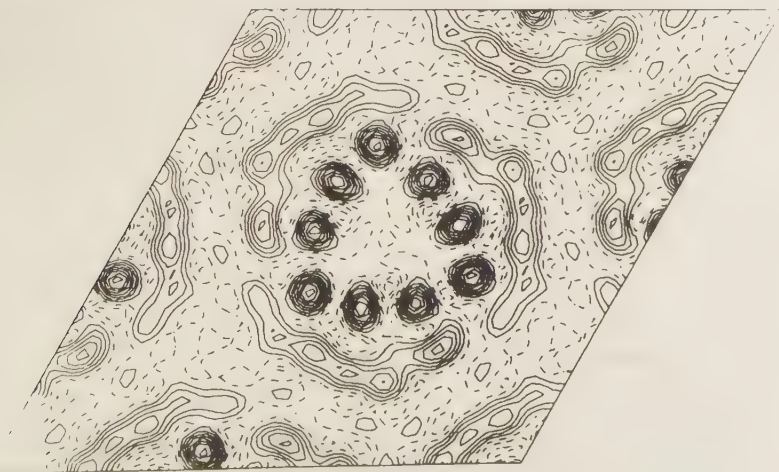


Abb. 20 a: Elektronendichtekarte aus Elektronendiffraktionsbildern von PM

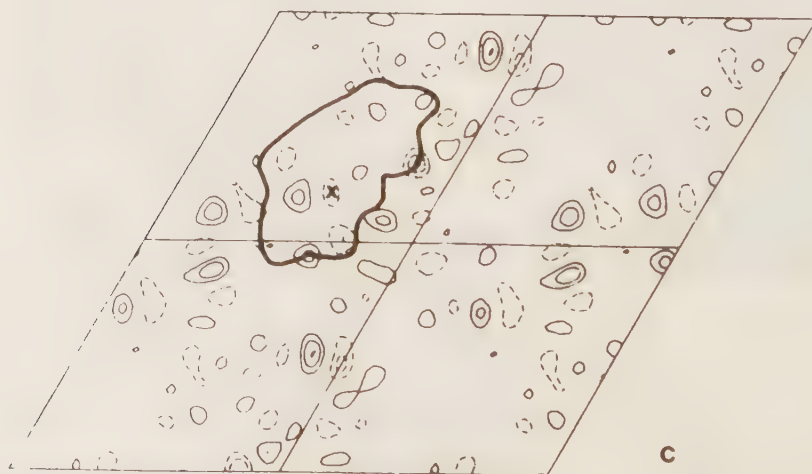


Abb. 20 b und c Elektronendichtekarte aus einem Elektronendiffraktionsbild von 21-BR (b) und Differenzkarte von 20 a und 20 b (c). Der Cyclohexenring von Retinal könnte bei **X** lokalisiert sein. Die durchgezogene Linie deutet den Bereich der sieben α -Helices an (vgl. Abb. 20 a).

Auf der Differenzkarte Abb. 20c zwischen PM und 21-BR sind zwar Signale (X) in dem Bereich zu erkennen, in dem auch Jubb et al. (91) aus Neutronenbeugungsdaten Retinal lokalisierten, aber diese können genauso gut aus dem Rauschen entstanden sein. Es wäre notwendig, sehr viele (> 100) Diffraktionsbilder auszuwerten, um den statistischen Fehler und die Fehler durch nicht ausreichend kristalline Membranen zu erkennen. Die Diffraktionsbilder von 20-BR und 19-BR zeigten noch geringere Auflösung als die von 21-BR, sodaß hier keine Datenanalyse vorgenommen wurde.

Isomorphe Kristalle von PM ließen sich also nicht durch Retinalanaloga ohne Cyclohexenring und AM herstellen, obwohl im parallel dazu ausgeführten Experiment mit Retinal und AM Purpurmembran mit den nativen kristallinen Eigenschaften entstand. Die Analog-BR zeigten nur verminderte Protonentransportaktivität (vgl. Kap. 3.3.1). Der Cyclohexenring ist für die Ausbildung der nativen und aktiven Tertiärstruktur notwendig.

3.5 13-Azidoretinal in Bacterio-opsin

Eine indirekte Methode zur Lokalisierung von Aminosäuren in der Nachbarschaft von Retinal basiert auf der Ausbildung einer weiteren kovalenten Bindung von Retinal zum Protein neben der der Schiffischen Base mit Lysin-216. Huang et al. führten ein Diazirin zur Photoaffinitätsmarkierung an C-2 bzw. C-4 von Retinal ein (93) (siehe auch Kap. 3.4) und verwendeten Phenyl anstelle Cyclohexenyl. Der prozentual größte Anteil an Quervernetzung geht nach Helix F an die Aminosäuren Glu-194 und Ser-193 (93). Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, ob eine erhöhte Reaktivität des bei Belichtung entstehenden Carbens mit polaren Aminosäuren einen dirigierenden Einfluß hat. Weiterhin ist es möglich, daß die Proteinkonformation unter Reaktionsbedingungen nicht konstant blieb.

Eine Photoaffinitätsmarkierung an C-13 könnte selektive Quervernetzung zum Protein ermöglichen. Für diese Annahme sprechen folgende Gründe:

- (i) Der Substituent an C-13 unterliegt oberhalb und unterhalb der Kettenebene von Retinal starken sterischen Wechselwirkungen mit dem Protein (1, 50). Es gibt Aminosäureseitengruppen mit van der Waals-Kontakt zum Substituenten.
- (ii) Es gibt keinen Hinweis auf die Nähe polarer Gruppen.
- (iii) Größere Substituenten wie Ethyl und Propyl, die eine Konformation in der Kettenebene einnehmen können, stören die

Rekonstitution von Analog-BR nicht.

Die Synthese von 13-Azidoretinol wurde in Abschnitt 3.1.2 behandelt. Im Folgenden werden die Ergebnisse zu 13-Azidoretinol in Bacterio-opsin dargestellt.

3.5.1 Rekonstitutionsverhalten und Photolyseversuche

a) Inkubation mit WM bei Raumtemperatur

WM-Suspensionen wurden in Wasser, 4M Natriumchlorid, 0,2M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, 0,1M Natriumacetat, 0,1M Natriumtetraphenylborat und auch in 0,1M Ammoniumchlorid hergestellt und bis zu zwei Wochen lang mit halbäquimolaren, äquimolaren und mehrfach molarem Überschuß von 13-Azidoretinol bei Raumtemperatur inkubiert. In keinem der Inkubationsansätze entstand ein Chromophor, dessen Absorptionsmaximum längerwellig als 380 nm war. Überraschenderweise erfolgte eine leichte Verschiebung der Absorption zu kürzeren Wellenlängen (hypsochrom) mit Maximum bei 360 nm und leichter Schulter bei 380 nm. Der Vergleich der Retentionszeiten bei Trennung von 13-Azidoretinol auf HPLC-Säulen vor Inkubation mit WM und nach Extraktion im Anschluß an die Inkubation zeigte, daß das Analog unverändert blieb. Die hypsochrome Verschiebung der Absorption im Protein deutet auf Bindung als nicht protonierte Schiff'sche Base hin.

b) Belichtungsexperimente

Falls ein anderes cis/trans-Isomer als das vorliegende

besser zur Rekonstitution geeignet sein könnte, wird photochemisch isomerisiert, um das Isomer zu erhalten, welches mit Bacterio-opsin reagiert. Bei Belichtung an der längerwelligen Flanke der Absorptionsbande (Kantenfilter 400 nm) nahm die längerwellig absorbierende Komponente zu Gunsten der Absorption bei 360 nm ab, ebenso bei Verwendung von Licht der Wellenlängen 370-460 nm. Bei Verwendung einer Farbgglaskombination (SFK 340/50) mit Lichtdurchlässigkeit von 315 bis 365 nm entstand ebenfalls kein Chromophor mit bathochrom verschobener Absorption. 13-Azidoretinal bildet also keine protonierte Schiff'sche Base mit BO.

c) Inhibitorverhalten

WM-Proben in H_2O mit steigender Konzentration an 13-Azidoretinal wurden bei Raumtemperatur mit 1,5facher Menge an Retinal versetzt und die Rekonstitutionsgeschwindigkeit von BR gemessen. Sie wurde bei Anwesenheit von 13-Azidoretinal vermindert, bei äquimolaren Mengen des Retinalanalogs auf 40% herabgesetzt und blieb dann bei höheren Konzentrationen konstant. Dies zeigt, daß 13-Azidoretinal die Retinalbindungsstelle von BO besetzt (2).

d) Photolyseversuche

WM-Proben ($16\mu M$) wurden mit äquimolaren Mengen an 13-Azidoretinal im Dunkeln inkubiert. Die Belichtung (Kantenfilter 340 nm, 150 W) erfolgte parallel mit der Belichtung an WM-Proben als Referenz. Nach 2 min war die

Rekonstitutionsgeschwindigkeit mit Retinal nach wie vor nur auf 40% herabgesetzt und BR wurde vollständig rekonstituiert. Bei Quervernetzung wäre zu erwarten, daß die Bindungsstellen einiger BO-Moleküle irreversibel besetzt blieben. Bei längerdauernden Belichtungen nahm die Rekonstitutionsfähigkeit mit Probe und Referenz parallel zueinander ab.

3.5.2 Fluoreszenz nach Reduktion mit Natriumborhydrid

Wird PM mit NaBH_4 und Licht behandelt, so erfolgt Reduktion an der Schiffischen Base zum Retinyllysin, welches im Gegensatz zur Schiffischen Base fluoresziert. Ein Vergleich der n-Butylamin-SB von Retinal und von 13-Azidoretinal zeigt, daß beide nicht fluoreszieren. Nach Reduktion mit NaBH_4 beträgt die Fluoreszenz von 13-Azido-retinylbutylamin etwa 20% der Fluoreszenz von Retinylbutylamin.

WM- und AM-Proben mit Retinal, mit 13-Azidoretinal und ohne Retinal(analog) wurden wie oben beschrieben reduktiv behandelt und anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteinbande aus der 13-Azidoretinalprobe fluoreszierte nicht stärker als WM bzw. AM, sodaß die Ausbildung einer Schiffischen Base nicht nachgewiesen werden konnte.

Notwendig für die Verwendung eines Retinalanaloges zur Photoaffinitätsmarkierung wären die Ausbildung einer Schiffischen Base mit Lysin-216, die zum Retinyllysin

reduzierbar ist, außerdem eine Photolysereaktion, in dessen Folge die Bindungsstelle für Retinal irreversibel besetzt bleibt. Beide Reaktionsmuster konnten mit 13-Azidoretinal nicht realisiert werden.

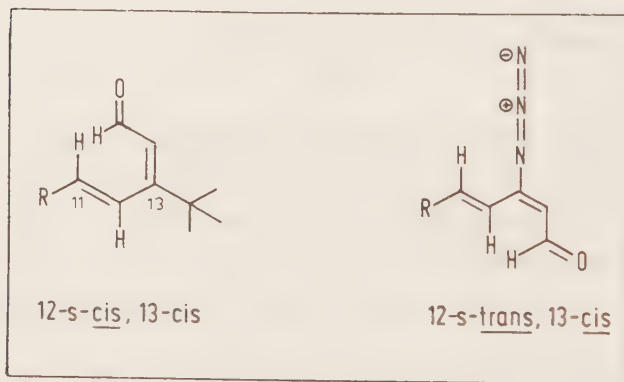


Abb. 21:

13-tert.-Butylretinal und 13-Azidoretinal. Der Substituent an C-13 beeinflusst die 12-s-cis/12-s-trans-Konfiguration. R steht für den Rest des Retinalanalogs.

Im Anschluß an diese Versuchsreihe stand uns 13-tert.-Butylretinal (54) zur Verfügung, welches nicht mit WM zu Analog-BR rekonstituiert. Wie mit ^1H -NMR-Daten aus NOE-Experimenten nachgewiesen wurde, kommt dieses Retinalanalog in organischen Lösungsmitteln nur als 13-cis-und, überraschenderweise, als 12-s-cis-Isomer vor (54) (Abb. 21), während 13-Azidoretinal als 12-s-trans,13-cis-Isomer vorliegt (vgl. Abschn. 3.1.2). Eine im Protein bevorzugte 12-s-cis-Konformation von 13-Azidoretinal könnte die Ausbildung der Schiffschen Base verhindern.

3.6 Rotation am Kettenende während des Photozyklus, 9,12-Phenylretinal-Bacteriorhodopsin

Während des Photozyklus erfolgt eine reversible all-trans nach 13-cis-Isomerisierung an Retinal und Protonierung Deprotonierung der Schiff'schen Base. Nicht bekannt war, zu welchem Zeitpunkt diese Isomerisierung stattfindet. Im Protein werden die Konformationsfreiheiten von Retinal stark eingeschränkt. Deshalb besteht die Möglichkeit, durch Verwendung bestimmter Retinalanaloga die trans- nach 13-cis-Isomerisierung zu verhindern.

	Retinalanalogs/ Retinal (Isopropanol) $\lambda_{\max}(\text{nm})$	prot. n-Butylamin- Schiff'sche Base (Isopropanol) $\lambda_{\max}(\text{nm})$	Bacterio- rhodopsin (H ₂ O) $\lambda_{\max}(\text{nm})$	Opsin- shift (cm ⁻¹)
all-trans Phenylretinal	330	380 (26320)	490 (20410)	5910
7 - cis Phenylretinal	323	372	-	-
13-cis Phenylretinal	305	365	-	-
all-trans- Retinal	380	440 (22730)	568 (17610)	5120

Tab. 4: Absorptionsdaten zu 9,12-Phenylretinal

3.6.1 Protonierte Schiffsche Base von 9,12-Phenylretinal mit Bacterio-opsin

9,12-Phenylretinal 2 liegt in organischen Lösungsmitteln als all-trans- und als 13-cis-Isomer vor (Kap. 3.1.1). 13-cis-9,12-Phenylretinal ist jedoch wegen sterischer Hinderung um die 12,13-Einfachbindung verdreht. Die all-trans-Verbindung 2a rekonstituiert innerhalb weniger Minuten mit WM bzw. AM zu Analog-BR unter Bildung eines Chromophors mit Absorptionsmaximum bei 490 nm. Der Opsin-shift entspricht dem von Retinal in BR (Tab. 4). Mit Resonanz-Raman Experimenten an Membransuspensionen in H₂O und in D₂O läßt sich nachweisen, ob eine protonierte Schiffsche Base vorliegt (zum Resonanz-Raman Experiment und die Anwendung bei Proteinen siehe A. T. Tu (95) und die dort zitierte Literatur). Die C=N-Streckschwingung der protonierten Schiffschen Base von BR liegt bei 1644 cm⁻¹ (96-98) und wird nach H/D-Austausch um 22 cm⁻¹ zu kleineren Wellenzahlen hin verschoben. Bei H/D-Austausch an 9,12-Phenylretinal-BR wurde die C=N-Streckschwingung von 1635 cm⁻¹ nach 1618 cm⁻¹ verschoben (Abb. 22a/b) (99). Die Differenz liegt in gleicher Größenordnung wie für BR. 9,12-Phenylretinal-BR liegt also als eine protonierte Schiffsche Base vor.

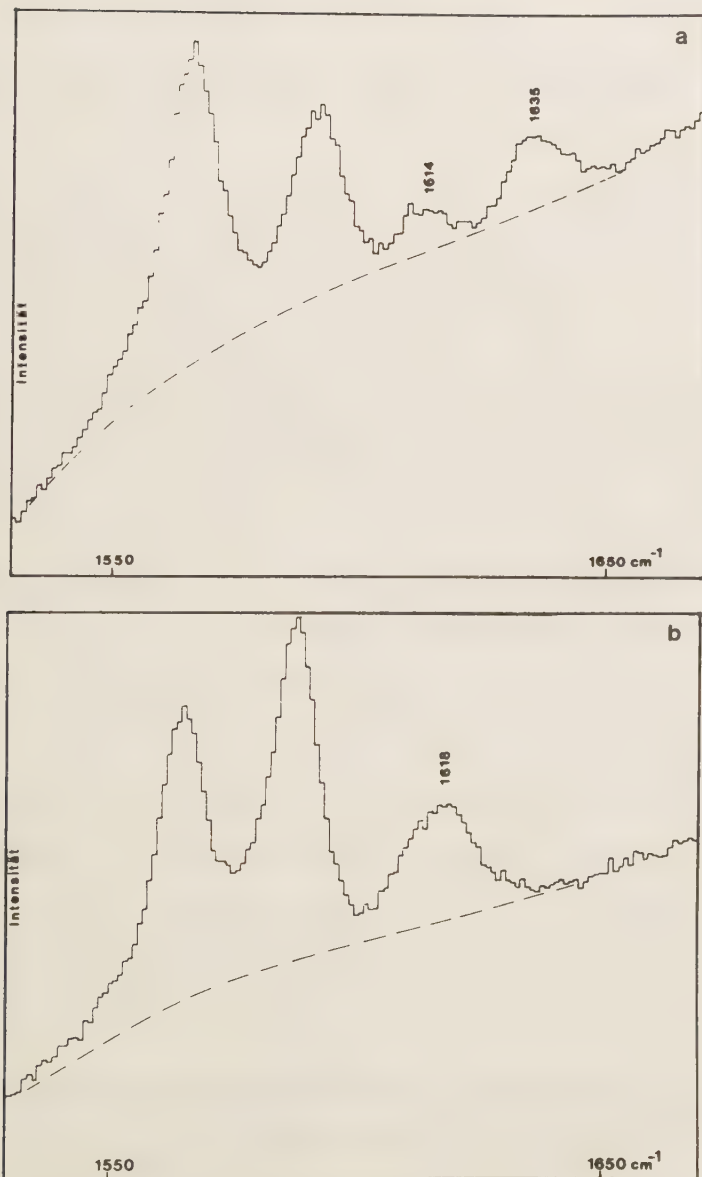


Abb. 22: Ausschnitt aus dem Resonanz-Raman-Spektrum von
9,12-Phenylretinal-BR in H_2O (a) und in D_2O (b)

3.6.2 13-cis-9,12-Phenylretinal rekonstituiert nicht mit Bacterio-opsin

Eine Rekonstitution von 9,12-Phenylretinal-BR gelingt nur mit der all-trans-Verbindung 2a. Mehrstündiges Belassen von WM mit dem 13-cis-Isomer 2b führt zur langsamen Isomerisierung nach all-trans und Bildung des Chromophors bei 490 nm, was durch Extraktion des Retinal-Analogs aus dem Protein und anschließende Bestimmung der Isomerenverteilung nachgewiesen werden konnte. Verbindung 2 ist das erste Retinal-Analog, dessen 13-cis-Konfiguration nicht in die Bindungsstelle des Bacterio-opsins paßt. Im Gegensatz zum all-trans-Isomer liegt 13-cis in organischen Lösungsmitteln nicht planar vor (vgl. Kap. 3.1.1). Die 13-Methylgruppe liegt nicht in der Ebene des Phenylringes, beansprucht also Raum oberhalb bzw. unterhalb der Kette. Dieser Raum steht im Protein nicht zur Verfügung. An der 7-cis-Verbindung wurde keine thermische Isomerisierung beobachtet. Die Rekonstitution fand erst nach Belichtung statt. Aus den rekonstituierten Proben war ausschließlich das all-trans-Isomer 2a zu isolieren.

3.6.3 Die Verhinderung des Photozyklus korreliert mit Inaktivität im Protonentransport

Wie Funktionsuntersuchungen mit Zellvesikeln zeigten, ist 2-BR inaktiv. Ebenso konnte in Untersuchungen des Photozyklus mit Nanosekundenblitzen kein Ausbleichen bei 490 nm beobachtet werden. Um zu untersuchen, ob für

all-trans-2-BR ein Intermediat im Photozyklus entsteht, wurden von H.-J. Polland et al. (100) Absorptionsmessungen mit Picosekundenblitzen durchgeführt.

Zur Kontrolle wurde zunächst BR aus Retinal und AM rekonstituiert und erste Schritte des Photozyklus mit Picosekundenblitzen gemessen. Die Ergebnisse waren identisch zu entsprechenden Untersuchungen an PM (100). Durch die Probenpräparation entstehen also keine Veränderung am Protein, die Einfluß auf die Bildungsgeschwindigkeiten der ersten Intermediate des Photozyklus hätten.

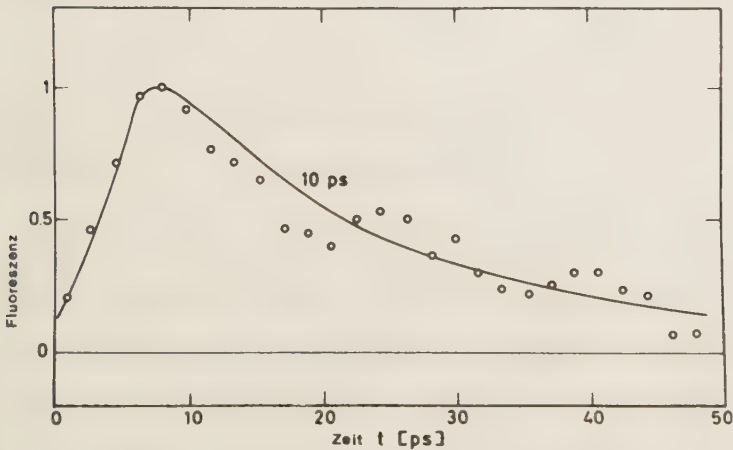


Abb. 23: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz von 9,12-Phenylretinal-BR.

Anregungswellenlänge: 526,5 nm, Messung bei $\lambda > 570$ nm

Die Fluoreszenzquantenausbeute von 2-BR (100) ist ungefähr 15mal größer als die von BR (5). Die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustandes von 2-BR ist signifikant länger als die unter gleichen Bedingungen gemessene von BR. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz von 2-BR ($\lambda > 570$ nm) während und nach der Anregung mit Lichtpulsen von 4 ps Dauer bei 526,5 nm ist in Abb. 23 gezeigt. Die Fluoreszenz erreichte während der Anregung ihr Maximum und fiel exponentiell mit einer Zeitkonstante von 10 ± 4 ps ab. Außerdem wurde je nach Wahl der Wellenlänge des Meßpulses lichtstimulierte Verstärkung des Pulses oder aber Absorption im angeregten Zustand beobachtet. Beide Phänomene sind wie die Fluoreszenz proportional der Besetzung des angeregten Zustandes. Verstärkung und Absorption nahmen ebenfalls mit Zeitkonstanten von jeweils 10 ps ab. Innerhalb von 100 ps entstand keine Absorptionsänderung, die ein Intermediat des Photozyklus anzeigen würde. In 9,12-Phenyl-retinal-BR wurde kein bathochrom verschobenes Photozyklusintermediat gefunden (100). Es wird also kein Intermediat analog zu J oder K gebildet. Der angeregte Zustand hat gegenüber BR eine längere Lebensdauer und relaxiert direkt in den Grundzustand. Für die Wechselwirkungen des Retinals von C-13 bis zur Schiffschen Base folgt damit erstens, daß Rotationen um C-13 oder/und C-14 nur möglich sind, wenn die 13-Methylgruppe im Protein nicht aus der Ebene der Polyenketten gedreht wird und zweitens, daß bei der Bildung des ersten Photozyklusintermediates bereits eine solche Rotation stattfindet.

3.7 13-Desmethylretinalanaloga in Bacterio-opsin

13-dm-Retinal-BR enthält in der lichtadaptierten Form 15 % all-trans-13-dm-Retinal und 85 % 13-cis (1) (vgl. BR: 100 % all-trans). Im all-trans-Photozyklus dieses Analog-BRS hat das Photozyklusintermediat **M** eine dreifach längere Lebensdauer als im BR_t - Photozyklus (101). Bei Verlängerung der Alkylkette an Position 13 verändert sich das all-trans zu 13-cis Verhältnis in den Analog-BR in der lichtadaptierten Form ebenfalls zu Gunsten von 13-cis. Der all-trans-Photozyklus bleibt jedoch unverändert. Hieraus folgt, daß die Alkylsubstitution und damit die Methylsubstitution an Position 13 eine Fixierung im Protein ermöglicht, die eine Verminderung der thermischen Isomerisierungsbarriere für die Rückreaktion nach all-trans bewirkt (1).

Die Geschwindigkeit der Bildung von BR und von Analog-BR ist bei Verwendung von 13-cis-Retinalen meist größer als bei all-trans-Retinalen (Ausnahmen: 9-dm-Retinal (1), 5-Ethylretinal, 9,12-Phenylretinal). So reagiert 13-cis-Retinal viermal schneller mit BO als all-trans. 13-cis-13-dm-Retinal reagiert fast zweihundertmal schneller als all-trans-13-dm-Retinal (1). Darüberhinaus rekonstituiert 13-dm-Retinal-BR um zwei bis drei Zehnerpotenzen langsamer als BR (1).

Auch 13-dm-11,12-Didehydreretinal 35 (Tab. 2d) und 13-dm-9,12-Phenylretinal zeigen in BO verschiedenes Verhalten von den entsprechenden 13-Methylretinalanaloga.

3.7.1 13-dm-11,12-Didehydroretinal

Die Absorptionsmaxima von 11,12-Didehydroretinal 31 (365 nm), 13-dm-11,12-didehydroretinal 35 (365 nm) und der entsprechenden SBH^+ (410 bzw. 412 nm) in Isopropanol unterscheiden sich kaum (Tab. 2c und 2d). Wie BR (vgl. Kap. 2.2) zeigt 31-BR Licht- und Dunkeladaptierung ($\lambda_{\text{max}} = 535$ bzw. 525 nm). Überraschenderweise erfolgt jedoch mit all-trans-35 keine Rekonstitution (Abb. 24a). Erst bei Belichtung ($\lambda = 374$ nm) entstand Analog-BR mit Absorptionsmaximum bei 545 nm. Der isosbestische Punkt liegt bei 455 nm. Wird dieser Chromophor belichtet ($\lambda > 570$ nm), entsteht freies Retinalanalog mit Absorptionsmaximum bei 374 nm. Wiederum liegt der isosbestische Punkt bei 455 nm. 13-dm-11,12-Didehydroretinal-BR ($\lambda_{\text{max}} = 545$ nm) läßt sich auch direkt durch Inkubation von 13-cis-13-dm-11,12-Didehydroretinal mit WM herstellen (Abb. 24b). Bei Raumtemperatur sind während der Rekonstitution keine Intermediate (z.B. ein 430 - 460 nm Chromophor, vgl. Abb. 7) erkennbar.

13-cis-31-BR isomerisiert thermisch nach all-trans-31-BR (ca. 60%), was durch Extraktion und anschließende HPLC-Analyse nachgewiesen wurde. Allerdings zerfällt 31-BR bei Belichtung in all-trans-31 und BO. Die Protonentransportaktivität, die mit dem Photozyklus von all-trans-BR korreliert (vgl. Kap. 3.2.5), beträgt 6%. Das 13-Methylderivat 31-BR zeigt eine vergleichbare Protonentransportaktivität von 8%.

7,8-Didehydreretinal 9 (Tab. 2c) (3) und 9-dm-7,8-Didehydreretinal 36 (Tab. 2e) weisen Absorptionsmaxima von 515/532 (3) bzw. 510 nm auf. Sowohl 13-cis- als auch all-trans-Isomer bilden mit BO Analog-BR, und zwar unabhängig von dem Vorhandensein der 9-Methylgruppe.

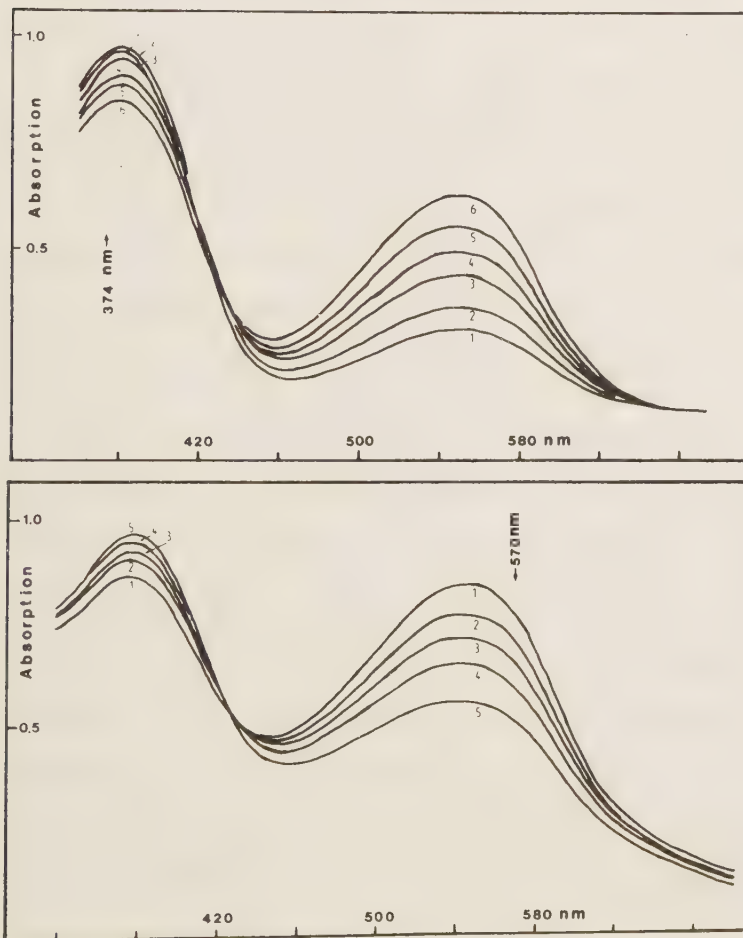


Abb. 24: Rekonstitution von 13-dm-11,12-Didehydreretinal-BR in AM a) mit dem all-trans-Isomer bei Belichtung bei 374 nm, 1. vor Belichtung, 2. nach 1min, 3. nach 4min, 4. nach 5min, 5. nach 7min und 6. nach 15min Belichtung, b) mit dem 13-cis-Isomer. Bei Belichtung bei $\lambda > 570$ nm entsteht wieder freies Retinalanalog. Spektrum 1. vor Belichtung, 2. nach 15 sec, 3. nach 30 sec, 4. nach 1min und 5. nach 5min Belichtung. Referenz: AM

3.7.2 13-dm-9,12-Phenylretinal

Für 9,12-Phenylretinal-BR konnte gezeigt werden, daß eine Drehung um die 12,13-Einfachbindung, die für die Ausbildung von 13-cis-9,12-Phenylretinal erforderlich ist, im Protein verhindert wird. Entscheidend für die Wechselwirkungen mit dem Protein ist die 13-Methylgruppe, die im 13-cis-Isomer nicht mehr in der Ebene der Polyenkette liegt. Wenn die 13-Methylgruppe fehlt, sollte demnach nicht nur das all-trans sondern auch das 13-cis-Isomer ein Analog-BR bilden. Entgegen dieser Erwartung zeigte es sich, daß all-trans-13-dm-9,12-Phenylretinal bei Inkubation mit BO kein Analog-BR bildet. Nach Extraktion der Inkubationsmischung lag unverändert all-trans-13-dm-9,12-Phenylretinal vor (Tab. 5). Bei Photoisomerisierung in Isopropanol entstanden 13-cis-, 7-cis- und all-trans-13-dm-9,12-Phenylretinal im Verhältnis 5 : 47 : 48. Das 13-cis-Isomer wurde durch HPLC isoliert. Dieses Isomer reagierte im Dunkeln erwartungsgemäß mit WM zum Analog-BR ($\lambda_{\max} = 492 \text{ nm}$). Absorptionsspektren wurden zu verschiedenen Zeiten gemessen und Proben zur Extraktion entnommen (Tab. 5). Die Analyse durch HPLC ergab, daß aus 13-cis-13-dm-9,12-Phenylretinal-BR in thermischer Reaktion bis zu 80% all-trans-Analog-BR entstand (Tab. 5).

Tabelle 5: 13-cis-13-dm-9,12-Phenylretinal (c) und all-trans-13-dm-9,12-Phenylretinal (t) wurden im Dunkeln mit Weißer Membran inkubiert und zu verschiedenen Zeiten extrahiert. Die Isomerenverteilung nach Inkubation wurde über HPLC bestimmt. Beide Isomere wurden parallel dazu bei Raumtemperatur in Isopropanol belassen und ebenfalls auf Isomerisierung hin kontrolliert.

Probe	Zeit	Absorptions- maximum (nm)	Isomerenverteilung	
			13-cis (%)	all-trans (%)
c + WM	2min	410	89	11
	1h 40min	494	44	56
	2h 30min	494	46	54
	3h	496	35	65
	4h	496	21	79
t + WM	1h 40min	355	1	99
	2h 30min	355	1	99
Isopr.				
c	4h	325	98	2
t	4h	345	1	99

3.7.3 13-cis- und all-trans-Retinal-BR

Bei der Rekonstitution von PM entsteht aus BO und 13-cis-Retinal BR_c und aus BO und all-trans-Retinal BR_t . BR_c und BR_t stehen miteinander im Gleichgewicht (Abb. 25). Die Isomerisierung verläuft langsamer als die Ausbildung der Schiffischen Base (1).

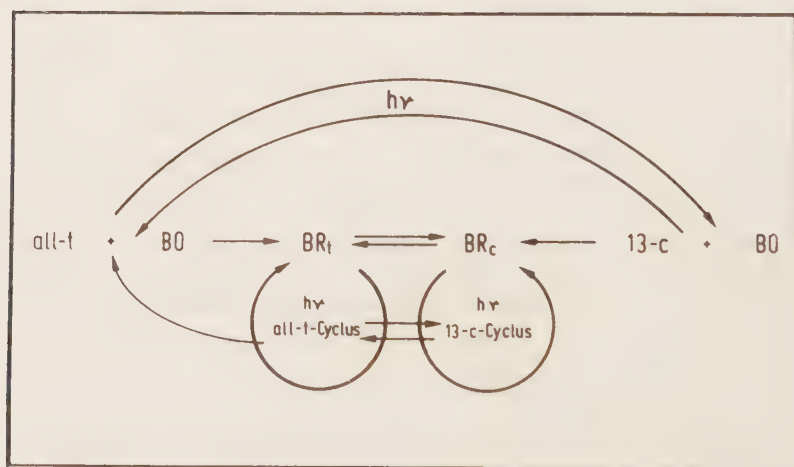


Abb. 25: Schema der Reaktionen von Retinal, Bacterio-opsin und Bacteriorhodopsin. Siehe Text.

Mit den beiden Analoga 13-dm-11,12-Didehydroretinal 35 und 13-dm-9,12-Phenylretinal liegt das Gleichgewicht der Reaktion all-trans-Retinal + BO $\rightarrow$ BR_t weit auf der linken Seite, sodaß kein Analog-BR gebildet wird. Die Reaktion 13-cis-Retinal + BO $\rightarrow$ BR_c führt jedoch zu einem Analog-BR. Über das Gleichgewicht zwischen BR_c und BR_t wird dann das Edukt des all-trans-Photozyklus gebildet. Bei Belichtung von trans-13-dm-11,12-Didehydroretinal-BR wurde Protonentransportaktivität nachgewiesen, wobei jedoch das freie all-trans-Retinalanalog und BO entstanden. Erst das 13-cis-Isomer rekonstituiert wieder mit BO (Abb. 25). Dieses Verhalten erinnert an die Photoreaktion von Rhodopsin. Rhodopsin wird aus 11-cis-Retinal und Opsin rekonstituiert und ist Edukt der Photoreaktion, deren Endprodukt aus freiem all-trans-Retinal und Opsin besteht. Erst nach Isomerisierung zu 11-cis-Retinal wird erneut Rhodopsin gebildet.

3.8 Optische Spektroskopie an Purpurmembran und an Bacteriorhodopsin im pico- und femto-Sekundenbereich

Von besonderem Interesse sind die ersten Ereignisse im Photozyklus. Mit der Entstehung des ersten Intermediates wird die Lichtenergie in BR gespeichert. Es gab bereits viele Untersuchungen zu den ersten Schritten des Photozyklus, jedoch widersprachen sich diese Ergebnisse zum Teil. Mit Hilfe der Femtosekunden- (M.C. Nuss et al., 1985 (4)) und Picosekundenspektroskopie (H.-J. Polland et al., 1986 (5)) gelang es, die ersten Intermediate J und K des Photozyklus quantitativ zu charakterisieren.

3.8.1 Purpurmembran

An Purpurmembransuspensionen in H_2O und D_2O wurden Absorptions- und Emissionseigenschaften gemessen (5). Mit dem verwendeten Laser-Anregungs- und Detektionssystem konnten Einzelblitzmessungen bei niedriger Anregungsenergie (nur 1/10 des BR wurde angeregt) durchgeführt werden. Bei Anregung mit Blitzen bei $\lambda = 540$ nm und Messung bei $\lambda = 555$ nm wurde Absorptionsabnahme beobachtet. Mit einer Zeitkonstante von 5 ps nahm die Absorption zu, erreichte jedoch nicht die ursprüngliche Absorption (Abb. 26a), sondern blieb bis mindestens 300 ps konstant (Abb. 26b), was die Bildung des Photoproduktes K anzeigte. K wurde nicht direkt aus S_1 gebildet, sondern es entstand zuvor ein

kurzlebige Produkt J (Abb. 26a). Die Messungen mit einer Auflösung von 0.3 ps ergaben, daß sich J aus S_1 mit einer Zeitkonstanten < 1 ps bildet. Die Aufnahme von transienten Spektren ergab für J eine bathochrome Verschiebung gegenüber K. Unter Berücksichtigung einer Quantenausbeute für J von 0.6 erhielt man Absorptionsspektren für J und K (siehe Lit. 5) mit Maxima bei 600 nm und 590 nm.

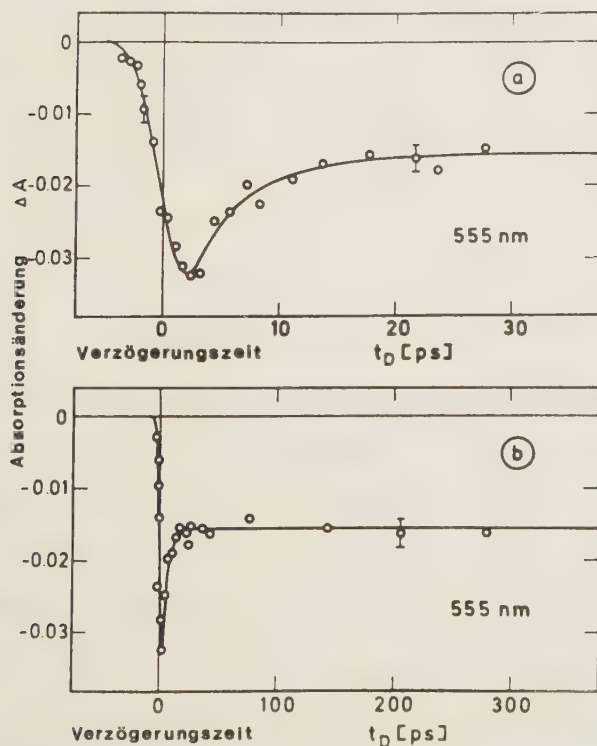


Abb. 26: Absorptionsänderungen von PM. Anregungsblitz bei $\lambda = 540$ nm, Messung bei 555 nm. a) J zerfällt mit einer Zeitkonstanten von 5 ps. b) Das entstehende Intermediat K hat eine Lebensdauer > 300 ps.

Durch Suspension und Belichtung von Purpurmembranen in D_2O wurde der Wasserstoff der Schiffischen Base gegen Deuterium ausgetauscht. Die Absorptionsänderungen an dieser Probe waren identisch zu den Änderungen an PM. Der fehlende Isotopeneffekt zeigte, daß bis zur Bildung von K keine Bewegung von Protonen stattfand (5).

Die Bildung des Intermediates K in 5 ± 1 ps wurde ebenfalls nach Anregung mit Blitzen von 160 fs Dauer gemessen (4). Das in 430 ± 50 ps entstehende Intermediat J bildete sich aus dem angeregten Zustand S_1 von BR. Es gibt kein weiteres Intermediat zu dieser frühen Zeit. Deuterierte PM verhält sich in den ersten Schritten des Photozyklus identisch zu nativer PM.

3.8.2 Bacteriorhodopsin-Trimere und -Monomere

Purpurmembran besteht aus Trimeren BR-Molekülen, die in einem zweidimensionalen, hexagonalen Gitter angeordnet sind. Licht wird von einem BR-Molekül absorbiert, wobei aufgrund excitonischer Kopplung jedoch nicht zwischen den Monomeren im Trimer unterschieden werden kann. Über die Geschwindigkeit eines Prozesses, durch den die Lichtenergie nach Absorption auf ein BR-Molekül BR_{mon}^* innerhalb dieses Trimers lokalisiert wird um dann die photochemische Reaktion zu bewirken, ist nichts bekannt. Dieser Übergang konnte auch bei Messung mit Femtosekundenblitzen nicht beobachtet werden, muß also in einer Zeit < 50 fs stattfinden. Deshalb war es interessant, BR aus dem zweidimensionalen

Gitterverband zu lösen und ebenfalls spektroskopisch zu analysieren.

Das Ausmaß der Aggregation von BR in der Purpurmembran (PM), den BR-Trimeren und den BR-Monomeren in Suspensionen oder Lösungen ist nicht genau bekannt. Deshalb werden charakteristische Eigenschaften zur Definition dieser Zustände herangezogen.

Purpurmembranen (PM) sind Membranen, die wie in Kap. 3.2.1 beschrieben isoliert wurden. Sie zeigen charakteristische Diffraktionsbilder im Röntgenbeugungsexperiment.

BR-Trimere enthalten Trimere oder Trimer-Aggregate von BR, die unter den für die Isolierung von PM angewandten Zentrifugationsbedingungen nicht sedimentieren. Sie erzeugen keine Diffraktionsbilder wie PM, zeigen aber excitonische Kopplung (CD-Spektroskopisch nachweisbar als Maximum bei 545 nm und Minimum bei 596 nm).

BR-Monomere enthalten Monomere oder Monomer-Aggregate und verhalten sich wie BR-Trimere, jedoch ist excitonische Kopplung nicht mehr vorhanden (CD-Spektrum mit $\lambda_{\max}$ bei 564 nm).

Aus BR-Trimer entsteht wie aus PM nach Anregung ein Intermediat in 430 ± 50 fs, wohingegen bei der BR-Monomer-Probe zwei Bildungskonstanten von $0,4 \pm 0,1$ ps und $1,0 \pm 0,3$ ps auftauchen (4). In monomerem BR liegt in der lichtadaptierten Form neben all-trans-Retinal auch zu 38 % 13-cis-Retinal vor (102). Es ist daher anzunehmen, daß die größere Zeitkonstante von 1.0 ps ein Photoprodukt im 13-cis-Zyklus anzeigt.

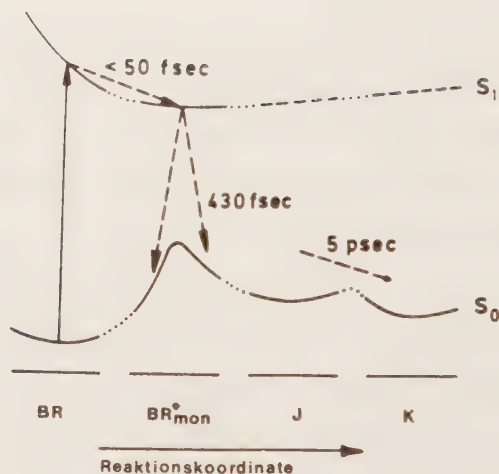


Abb. 27: Schematische Darstellung der Energieflächen von S_0 und S_1 entlang der Reaktionskoordinate für die ersten Schritte des Photocyclis von BR.

Die Energieflächen von S_1 und dem Grundzustand S_0 entlang der Reaktionskoordinate für die Photoreaktion von BR sind in Abb. 27 schematisch dargestellt. In weniger als 50 fsec nach Absorption eines Lichtquanten wird der angeregte Zustand eines einzelnen BR-Moleküls BR^*_{mon} erreicht, von dem aus mit einer Quantenausbeute von 0.6 das erste Intermediat J innerhalb von 430 fsec gebildet wird und der verbleibende Anteil der Moleküle direkt in den BR-Grundzustand zurückkehrt. Innerhalb von 5 ps erfolgt dann die Bildung von K.

4. Diskussion

Retinal als protonierte Schiffische Base in Bacteriorhodopsin (BR) durchläuft einen Photozyklus und katalysiert damit den Protonentransport mit Licht als Energiequelle. Die photochemische trans nach 13-cis Isomerisierung ist als Schalterfunktion zur Ladungstrennung anzusehen, die nach einem noch nicht bekannten Mechanismus Protonentransport im Protein ermöglicht. Im Photozyklus relaxiert die Schiffische Base thermisch nach intermediärer Deprotonierung und Reprotonierung wieder zum Ausgangszustand.

Mit der vorliegenden Arbeit gelang es, spezifische Wechselwirkungen von Retinal mit Bacterio-opsin (BO) zu charakterisieren. Diese sind sterisch, hydrophob oder ionisch. Nur der Vergleich verschiedener Analog-Bacteriorhodopsine ermöglicht die Diskriminierung der verschiedenen Wechselwirkungen.

Zunächst wird getestet, ob das Retinalanalog eine Schiffische Base mit Bacterio-opsin bildet oder nicht. Unterschiede zwischen Analog-BR und BR werden beurteilt anhand des Opsin-shiftes, der verminderten Protonentransportaktivität und der Tertiärstruktur. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ergibt sich aus der Isomerenverteilung (all-trans/13-cis) des Retinalanalogs in Bacteriorhodopsin nach Einstellung des thermischen Gleichgewichtes und bei photochemischer Reaktion.

Zur Interpretation der Ergebnisse wird zunächst die eingeführte Veränderung im Analog gegenüber Retinal erfaßt. Anschließend erfolgt die Charakterisierung der veränderten Wechselwirkung im Analog-Bacteriorhodopsin gegenüber Bacteriorhodopsin, um dann auf die Wechselwirkung, die im Falle von Bacteriorhodopsin dominiert, rückzuschließen.

In dieser Diskussion werden die Effekte besprochen, die durch Analog-BR, in denen Retinal erstens am Cyclohexenring, zweitens in der Kette und drittens im Bereich von C-13 modifiziert war, beobachtbar wurden.

Purpurmembran und Bacterio-opsin-Membranen unterscheiden sich in ihren Proteinkonformationen. Während PM zweidimensional hexagonal kristallisiert vorliegt, ist BO nicht kristallin. Ring und Kette von Retinol werden in BO planarisiert, die Anwesenheit von Retinol führt jedoch noch nicht zu kristallinen Membranen. Fehlt der Ringschluß am Retinal wie in den Polyenal-BR, zeigen Röntgenbeugungs- und Elektronendiffraktionsdaten der Analog-BR, daß diese fehlerhaft oder ebenfalls nicht kristalline Membranen sind. Die native Proteinkonformation wird nicht erreicht.

Für die gegenseitige Beeinflussung zwischen Retinal und Protein, die zur nativen Proteinkonformation führt, muß einerseits eine protonierte Schiff'sche Base vorliegen. Dann aber finden erkennbare Wechselwirkungen mit dem Cyclohexenring statt. Diese Wechselwirkungen führen auch für Retinal wahrscheinlich zu einer Planarisierung zwischen Ring und Kette. Gleichzeitig absorbiert Retinal in dieser

Konformation bathochrom im Vergleich zu Retinal in den möglichen Konformationen zwischen 0 und 180° aus der Drehung um die 6-s-Einfachbindung. Die blauverschobene Absorption von ringmodifizierten Analog-BR, bei denen die Alkylsubstitution an Retinal verändert wurde, ist damit als eine Abweichung der Winkelstellung von 0° zu interpretieren. Diese Abweichung wird groß, wenn die 5-Methylgruppe in Retinal fehlt (18 nm), nimmt aber dann weniger stark zu, wenn zusätzlich die 1,1-Dimethylgruppe fehlt (5 nm). Mit einem Diacetylenischen Retinalanalog entstand nur dann Analog-BR, wenn die drei Methylgruppen vorhanden waren. Die Alkylsubstitution an Retinal ermöglicht also die Fixierung des Rings im Protein.

Nun wird aber bei Analog-BR, nicht bei PM, ein Salzeffekt auf die Konformation zwischen Ring und Kette beobachtet. Spiroretinal- und 5-Ethylretinal-BR absorbieren nur bei Ionenstärken über 3 M mit Maximum bei 570 nm bzw. 548 nm (vgl. BR, $\lambda_{\text{max}} = 568 \text{ nm}$). Durch hohe Ionenstärken werden die Kräfte, die zur Planarisierung führen, größer. So verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 5-Ethylretinal-BR von 505 nach 548 nm. Jedoch wird für 5-Ethylretinal 28 auf Grund des vergrößerten Alkylrestes an C-5 die Planarität nicht erreicht.

Spiroretinal 26 enthält anstelle der beiden Methylgruppen an C-1 einen Cyclopropanring. Die sterische Veränderung gegenüber Retinal ist vernachlässigbar klein. Sie kann nicht Ursache für den Salzeffekt in Spiroretinal-BR (Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 570 nm beim Übergang von

H₂O auf Ionenstärke 3 M) sein. Die Veränderung kann nur in den chemischen Eigenschaften des Cyclopropanrings begründet sein. Nach der Valence Bond - Theorie erhalten Einfachbindungen bei Ringspannung weniger s-Charakter und stärkeren π -Anteil im Vergleich zu ungespannten C-C-Einfachbindungen. Dadurch findet Konjugation zum Doppelbindungssystem statt. Der Effekt des Cyclopropanringes bleibt jedoch geringer als die durch Doppelbindung erreichte Konjugation (75). Da Spiroretinal nur bei hoher Ionenstärke mit BO zu einem Chromophor mit maximaler Absorption bei 570 nm reagiert, müssen Aminosäurereste, die insbesondere mit dem Polyensystem des Retinals wechselwirken, in der Nähe des Cyclohexenringes sein. Dies können eine aromatische Aminosäure, z.B. Tryptophan oder eine polare Aminosäure, z.B. Tyrosin sein.

Salze beeinflussen Oberflächenladungen von Proteinen. An Myoglobinen wurde eine indirekte Wirkung von oberflächlich gebundenem Salz auf den pK-Wert von Aminosäuren im Protein gemessen (103). Ein Einfluß von Salz auf die Proteinkonformation ist anzunehmen. In den Analog-Bacteriorhodopsinen führt dieser Einfluß dazu, daß die Kräfte, die Ring und Kette des Retinals planarisieren, gestärkt werden. Bei ringmodifizierten Retinalanalog-BR ist die Protonentransportaktivität vermindert, wahrscheinlich als Folge der veränderten Proteinkonformation. Wichtig ist aber, daß die Aktivität qualitativ erhalten bleibt.

Die Kette von C-7 bis C-12 liegt wahrscheinlich all-trans und planar vor. So bildet auch noch das diacetylenische

Retinalanalog 12, in dem keine 6-, 8- und 10-s-cis/trans-Isomere vorkommen, mit BO ein Analog-BR. Gleichzeitig war bekannt, daß 7-, 9- und 11-cis Retinale nicht zur protonierten Schiffschen Base reagieren.

Die Reaktion von Retinal mit BO führt in den ersten Schritten zur Planarisierung von Kette und Ring. Der Ring wird somit fixiert, bevor im letzten Schritt die protonierte Schiffsche Base gebildet wird. Diese letzte Reaktion ist nur für die beiden längsten Retinalisomere, all-trans und 13-cis-Retinal, möglich. Jedoch bildet sich die Schiffsche Base auch aus mit dem Trienal 19, einer Polyenalkette, die zwar im Vergleich zu Retinal C-8 bis C-15 enthält, aber keinen Ring. Die Fixierung des Cyclohexenringes ist also keine Voraussetzung für die Bildung eines aktiven Analog-BR. Die Beschränkung der Retinalisomere in BR auf all-trans- und 13-cis-Retinal muß daher auf die sterischen Wechselwirkungen des Proteins mit der Retinalkette zurückzuführen sein.

In Abbildung 25 sind die Reaktionen von all-trans-Retinal (all-t), 13-cis-Retinal (13-c), all-trans-Bacteriorhodopsin (BR_t) und 13-cis-Bacteriorhodopsin (BR_c) zusammengefaßt. Mit Hilfe von Retinalanalog-BR gelang es, diese Reaktionen zu beeinflussen. Alle hierzu verwendeten Analoga wurden an oder in der Nachbarschaft zu C-13 modifiziert.

9,12-Phenylretinal 2 reagiert nur in der all-trans, nicht in der 13-cis Konfiguration mit BO. Die Kette dieses 13-cis-Isomers liegt nicht planar vor. Die 13-Methylgruppe befindet sich oberhalb/unterhalb der Polyenebene, was zwar

in organischen Lösungsmitteln, aber nicht im Protein möglich ist. Falls bei der Bildung des ersten Intermediates im Photozyklus noch keine trans nach cis Isomerisierung stattfinden würde, sollte man für die Photoreaktion von all-trans-9,12-Phenylretinal-BR ein Produkt erwarten. Dies entsteht jedoch nicht. Deshalb folgt, daß im ersten Schritt des nativen BR_t-Photozyklus Isomerisierungen im Bereich C-13 bis zur Schiffschen Base stattfinden.

Zwei weitere Analoga, 13-dm-11,12-Didehydroretinal 35 und 13-dm-9,12-Phenylretinal (dm = desmethyl), reagieren im Gegensatz zu den entsprechenden 13-Methylanaloga nur in der 13-cis-Konfiguration mit BO. Bis auf wenige Ausnahmen sind die Geschwindigkeitskonstanten bei der Reaktion mit BO für cis-Retinal(analoga) größer als für das trans-Isomer. Die Rekonstitution von 13-dm-Retinal-BR verläuft um zwei bis drei Zehnerpotenzen langsamer als die von BR und die Reaktionsgeschwindigkeit des 13-cis-Analog mit BO ist etwa zweihundertfach größer als die des all-trans-Analog mit BO. Die beiden 13-Desmethylretinale 13-dm-11,12-Didehydroretinal 35 und 13-dm-9,12-Phenylretinal sind zusätzlich noch in der Nachbarschaft zu C-13 modifiziert, was die Reaktionsgeschwindigkeit des all-trans-Analog mit BO offensichtlich auf null herabsetzt.

35-BR ist photochemisch aktiv. Außerdem konnte die Entstehung von 35-BR_t und 13-dm-9,12-Phenylretinal-BR_t (Abb. 25) durch Extraktion und anschließende HPLC-Analyse nachgewiesen werden. Daraus wird gefolgert, daß diese Analog-BR über das thermische Gleichgewicht zwischen BR_C und

BR_t trans-Analog-BR bilden. Aus 35-BR entsteht bei Belichtung wieder freies all-trans-35 und BO. Diese Reaktion erinnert an die Photoreaktion der Rhodopsine, bei denen 11-cis-Retinal zu all-trans isomerisiert wird und freies all-trans-Retinal und Opsin entstehen.

Die sterische Wechselwirkung des Proteins mit der Methylgruppe an C-13 haben regulative Funktion für die Rekonstitution von BR aus Retinal und BO, für die Photoreaktion und für die thermischen Reaktionen von Retinal in Bacteriorhodopsin.

5. Material und Methoden

Geräte:

Kernresonanzspektroskopie: Varian T60, Bruker WH90, Bruker WM400, Bruker 500

Infrarotspektroskopie: Perkin Elmer 157 G, Perkin Elmer 197;

Absorptionsspektroskopie: Aminco DW 2, Kontron Uvikon 810;

MS: Varian MAT 312

Chromatographie:

DC-Folien Polygram Alox N/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel & Co)

SC: Alumina Woelm, Akt. II-III nach Brockmann (WoelmPharma),

Kieselgel 60 (Artikel Nr. 7729, Merck)

HPLC: Altex 100 A Pumpe, Knauer 85.00 Durchflußphotometer,

Säulen 4,6 mm x 250 mm (analytisch) und 20 mm x 250 mm

(präparativ), gefüllt mit 7µm Lichrosorb Si 60 (Merck)

Röntgenkamera: Elliott Toroid-Kamera

Elektronenmikroskop: Philips EM 301

CD-Spektrometer: Auto. Dichrograph Mark V von ISA Jobin-Yvon

Material:

Trienai, Tetraenal, Pentaenal von Oxyl - Bobingen, 9,12-Phenylretinsäure und 13-dm-9,12-Phenylretinal von der BASF, n-Octyl-β-D-glucopyranosid von Sigma, Lösungsmittel und anorganische Salze von Merck, weitere Reagentien von Aldrich

Methoden:

a) HPLC-Bedingungen: Strömungsgeschwindigkeiten 1,4 ml/min

(60 bar) (analytisch) und 11,2 ml/min (140 bar) (präparativ). Die Detektionswellenlängen wurden zwischen 320 und 380 nm variiert. Elutionsmittel: Cyclohexan/Diethylether 80/20 bis 95/5.

b) Kernresonanzspektren wurden an Lösungen in CDCl_3 mit Tetramethylsilan als internem Standard aufgenommen. Bei ^1H -NMR-Daten werden nacheinander chemische Verschiebung δ (Multiplizität, Intensität / H,H-Kopplungskonstante $^3J_{\text{H,H}}$ (Hz)) und (Position) angegeben (s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, me = Methyl, dime = Dimethyl). In den Tabellen sind ebenfalls chemische Verschiebungen δ aufgeführt und jeweils darunter H,H-Kopplungskonstanten J ($^3J_{\text{H,H}}$ in Hz). Die Isomere sind hier zeilenweise aufgeführt, die Zuordnung spaltenweise. Nuclear Overhauser Effekt (NOE) und Nuclear Overhauser Effekt Spectroscopy (NOESY) Experimente werden gesondert angegeben. Im NOESY Experiment werden alle NOE-Effekte gleichzeitig erfaßt und zweidimensional dargestellt. Die Numerierung erfolgt immer nach der für Retinal üblichen Nomenklatur, auch wenn der systematische Name angegeben wurde (Das C-Atom des Aldehyds im Retinalanalog entspricht C-15 in Retinal).

c) Absorptionsspektren der Retinoide wurden in Isopropanol, Absorptionsspektren der Membransuspensionen in Wasser gemessen, die Wellenlängen bezeichnen Absorptionsmaxima. Abkürzungen: A_{280} = Absorption bei 280 nm, A_{560} = Absorption bei 560 nm.

5.1 Trienal 19, Tetraenal 20, Pentaenal 21

Die Analytik ergab folgende Daten:

Trienal (3,7-Dimethyl-octa-2,4,6-trienal) 19:

$^1\text{H-NMR}$ (90 MHz)

	9,9-dime	13-me	10	11	12	14	15
<u>all-trans</u>	1,88	2,30	5,99 J12	6,98 J12 J15,2	6,23 J15,2	5,94 J 8,2	10,1 J 8,2
<u>13-cis</u>	1,88	2,11	6,03 J10,2	6,87 J10,5 J15,5	7,14 J15,5	5,83 J 8,2	10,18 J 8,2

UV/VIS 336 nm, $\epsilon = 37000$

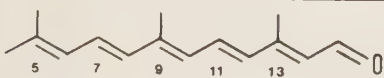
MS $\text{M}^+ 150$

Tetraenal (3,7-Dimethyl-deca-2,4,6,8-tetraenal) 20:

$^1\text{H-NMR}$ (90 MHz)

	9-me	13-me	6	7	8	10	11	12	14	15
<u>all-trans</u>	1,95	2,32	1,84	6,02 J16	6,29 J16,7		7,20 J16 J12		5,97 J8	10,1 J8,21

Die Resonanz der Protonen an C-10 und C-12 konnten im 90 MHz Spektrum nicht zugeordnet werden.

UV/VIS 363 nm, $\epsilon = 41000$ MS M^+ 176Pentaenal (3,7,11-Trimethyl-dodeca-2,4,6,8,10-pentaenal) 21: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; NOESY am 9-cis-Isomer)


	5,5-dime	9-me	13-me	6	7	8	10	11	12	14	15
all- <u>trans</u>	1,84	2,02	2,33	5,97 J16,0	6,62 J11,1 J15,1	6,24 J14,7	6,21 J10,5	7,12 J11,6 J15,0	6,37 J15,0	5,97 J 8,6	10,10 J 8,0
9- <u>cis</u>	1,86	2,02	2,33	6,03 J11,0	6,62 J11,0 J15,0	6,30 J15,0	6,07 J11,3	7,25 J11,7 J15,0	6,75 J15,1	5,97 J 9,1	10,10 J 9,0
13- <u>cis</u>	1,85	2,02	2,14		6,62 J11,0 J15,1	6,25 J14,5		7,02 J11,4 J14,8	7,27 J14,7	5,85 J 8,0	10,21 J 8,0

UV/VIS 388 nm, $\epsilon = 51000$ MS M^+ 216

5.2 9,12-Phenylretinol

Ansatz 500 mg (1,6 mmol) Säure

91 mg (2,4 mmol) LiAlH_4

50 ml Diethylether (abs.)

500 mg Säure in 20 ml Ether werden langsam bei 0° zu einer Suspension aus 91 mg LiAlH_4 in 25 ml Ether zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch dünnschichtchromatographisch und spektroskopisch untersucht.

Hydrolyse: nacheinander mit 1 ml H_2O

1 ml NaOH (15 %)

3 ml H_2O

Das Filtrat wird mit H_2O gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

Ausbeute: 87 %

UV/VIS 314 nm (Säure), 295 nm (Alkohol)

5.3 9,12-Phenylretinal

Ansatz 411 mg (1,4 mmol) Alkohol

5 g Mangandioxid auf Träger aktiv
gekörnt (Merck)

30 ml Dichlormethan

Mangandioxid wird in 25 ml Dichlormethan suspendiert und mit zwei Tropfen Pyridin versetzt. Zur Suspension wird der Alkohol in 5 ml Dichlormethan zugetropft. Die Durchmischung erfolgt durch Schwenken. Der Reaktionsverlauf wird über Absorptionsspektren verfolgt. Nach 5 Stunden Reaktionszeit wird in Diethylether (20 ml) aufgenommen, über eine 2 cm lange Aluminiumoxidsäule filtriert und anschließend mit Diethylether gewaschen. Nach extraktiver Aufarbeitung wird über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wird durch HPLC gereinigt.

Ausbeute: 80 %

¹H-NMR (400 MHz)

	1,1-dime	5-me	13-me	7	8	Aromat	13	14	15
all- <u>trans</u>	1,07	1,43	2,57	6,81 J16,4	6,35 J16,4	7,49	-	6,43 J 7,9	10,10 J 7,9
7- <u>cis</u>	1,07	1,43	2,55	6,18 J12,5	6,42 J12,5	7,47	-	6,43 J 7,9	10,18 J 7,9
13- <u>cis</u>	1,08	1,77	2,32	6,77 J16,3	6,37 J16,3	7,27/7,44	-	6,13 J 8,1	9,54 J 8,1

UV/Vis 330 nm (all-trans), 323 nm (7-cis),305 nm (13-cis)MS M⁺ 294

5.4 13-dm-9,12-Phenylretinal

Das Produkt von der BASF liegt als reines all-trans-Isomer vor. Photoisomerisierung in n-Hexan bzw. Cyclohexan/Diethylether resultiert in einem Gemisch von all-trans-und 7-cis Isomeren. Erst bei Isomerisierung in Isopropanol entsteht zu 5 % 13-cis, während die beiden anderen Isomere in äquimolarem Verhältnis vorliegen.

¹H-NMR (500 MHz)

	1,1-dime	5-me	13-me	7	8	Aromat	13	14	15
all- <u>trans</u>	1,08	1,77	-	6,81 J16,3	6,38 J16,3	7,43	7,46 J15,3	6,71 J 7,8 J16,0	9,70 J 7,4
7- <u>cis</u>	1,08	1,42	-	6,21 J11,9	6,42 J12,4	7,47	7,42 J15,9	6,69 J 7,7 J15,9	9,69 J 7,7
13- <u>cis</u>	1,09	1,79	-	6,80 J16,2	6,39 J16,3	7,38/7,46	7,58 J11,5	6,18 J 8,1 J11,3	10,03 J 8,1

UV/Vis 339 nm (all-trans), 334 (7-cis),
 324 nm (13-cis)
 MS M⁺ 280

5.5 13-Azidoretinal

Durch HPLC werden drei Fraktionen aus der 13-Azidoretinal Präparation isoliert. Neben 9,13-dicis- und 13-cis-Isomer entstand auch ein Aziridin durch Eliminierung von Stickstoff und Cyclisierung nach C-14.

¹H-NMR (500 MHz; NOE an 9,13-dicis und 13-cis,
 NOESY am Aziridin)

	1,1- dime	5-me	9-me	7	8	10	11	12	14	15
9,13- <u>dicis</u>	1,04	1,75	2,05	6,42 J16,1	6,18 J16,0	6,20 J11,6	7,38 J14,4 J11,9	6,88 J14,4	5,78 J 7,2	10,03 J 7,2
13- <u>cis</u>	1,05	1,76	2,05	6,39 J15,8	6,68 J16,0	6,11 J12,0	7,45 J14,2	6,82 J14,4	5,78 J 7,2	10,04 J 7,3
Aziridin	1,02	1,72	2,10	6,48 J15,9	6,61 J15,9	6,26 J11,9	7,43 J14,6 J12,1	6,60 J14,7	2,65 J 7,0	8,79 J 7,0

UV/Vis 379 nm (9,13-dicis), 380 nm (13-cis),
 342 nm (Aziridin)

5.6 5-Methoxy- β -ionon

Ansatz: 3,5 g (23 mmol) 5-Methoxy- β -cyclocitral

1,3 g (11 mmol) Kalium-t-butanolat

60 ml Aceton

120 ml Toluol

Bei Raumtemperatur wird Kalium-t-butanolat in 100 ml Toluol suspendiert und Aceton hinzugetropft. Die Lösung verfärbt sich hellgelb bis leicht braungelb. In weiteren 20 ml Toluol wird 5-Methoxy- β -cyclocitral hinzugetropft. In der ersten Stunde verfärbt sich die Lösung mittelbraun. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt (Färbereagenz nach Carr-Price). Nach 18 Stunden unter Rückfluß wird mit 75 ml Wasser hydrolysiert. Nach extraktiver Aufarbeitung wird über Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wird über eine Kieselgelsäule vorgetrennt und 5-Methoxy- β -ionon durch HPLC isoliert.

Ausbeute: 17 %

$^1\text{H-NMR}$ (90 MHz)

1,17(s,6)(1,1-dime); 2,28(s,3)(9-me);

3,68(s,3)(5-methoxy); 6,53(d,1/16,7)

(8); 7,52(d,1/16,7)(7)

UV/Vis

320 nm

5.7 5-Methoxy- β -ionylidencarbonsäurenitril (5-Methoxy-C-15-nitril)

Ansatz: 210 mg (1 mmol) 5-Methoxy- β -ionon

354 mg (2 mmol) Diethylphosphonatoacetonitril

60 mg (2 mmol) Natriumhydrid

10 ml Tetrahydrofuran (abs.)

Es wird in trockener Inertgasatmosphäre gearbeitet. Natriumhydrid wird in 6 ml THF vorgelegt. Man tropft Phosphonat in 1 ml THF hinzu. Langsam erfolgt Farbvertiefung nach orange. Nach Beendigung der Wasserstoffentwicklung wird der Aldehyd in 3 ml THF zugetropft. Der Reaktionsverlauf wird spektroskopisch verfolgt. Nach 30 Minuten wird hydrolysiert, extraktiv aufgearbeitet und über Natriumsulfat getrocknet. Die Trennung der Isomeren erfolgt durch HPLC. All-trans und 9-cis-Isomer entstehen im Verhältnis 66:33.

Ausbeute: 36 %

$^1\text{H-NMR}$ (90 MHz)

all-trans 1,14(s,6)(1,1-dime); 2,19(s,3)(9-me); 3,63(s,3)
(5-methoxy); 5,12(s,1)(10); 6,77(d,1/16)(7);
7,28(s,1)(8)

9-cis 1,18(s,6)(1,1-dime); 2,04(s,3)(9-me); 3,67(s,3)
(5-methoxy); 5,01(s,1)(10); 6,77(d,1/16)(7);
7,28(s,1)(8)

IR 2205 cm^{-1} , 1620 cm^{-1}

MS M^+ 231

5.8 5-Methoxy- β -ionyliden (5-Methoxy-C-15-Aldehyd)

Ansatz: 80 mg (0,4 mmol) 5-Methoxy-C-15-Nitril
 0,14 ml (0,7 mmol) Diisobutylaluminiumhydrid
 (DIBAH) (Toluol)
 20 ml Toluol (abs.)

Es wird in trockener Inertgasatmosphäre gearbeitet. Das Nitril wird in 10 ml Toluol vorgelegt. Man vermischt im Tropftrichter 0,14 ml DIBAH mit 10 ml Toluol und tropft langsam unter Rühren bei Raumtemperatur zu. Die vorerst schwach gelbliche Lösung verfärbt sich tiefgelb. Nach 1 Stunde wird nacheinander mit 1 ml Methanol und 2 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung hydrolysiert. Anschließend wird mit 10 ml Isopropanol versetzt und 1 Stunde lang gerührt. Der Niederschlag wird filtriert und das Filtrat extraktiv aufgearbeitet.

Ausbeute: 95 %

IR 1668 cm^{-1} , 1620 cm^{-1}

UV/Vis 350 nm

5.9 5-Methoxyretinsäurenitril

Ansatz: 80 mg (0,3 mmol) 5-Methoxy-C-15-Aldehyd
 130 mg (0,6 mmol) 3-Methyl-4-(Diethylphospho-
 nato)-2-butensäurenitril
 15 mg (0,6 mmol) Natriumhydrid
 20 ml Tetrahydrofuran (abs.)

Natriumhydrid wird in 10 ml THF vorgelegt, man tropft Phosphonat in 5 ml THF bei Raumtemperatur zu. Die Lösung färbt sich dunkelrot. Die Hydrolyse erfolgt mit 10 ml H₂O in 10 ml Diethylether. Es wird extraktiv aufgearbeitet und über Natriumsulfat getrocknet. Die Reinigung des C-20-Nitrils erfolgt über Kieselgelsäule und HPLC.

Ausbeute: 36 %

IR 1665 cm⁻¹

5.10 5-Methoxyretinal

Ansatz: 30 mg (0,1 mmol) 5-Methoxy-C-20-Nitril
 0,1 ml (0,5 mmol) Diisobutylaluminiumhydrid
 10 ml Toluol (abs.)

Die Durchführung der Reaktion erfolgt wie bei der Darstellung von 5-Methoxy-C-15-aldehyd beschrieben.

Ausbeute: 70 %

¹H-NMR (90 MHz)

α 0,91/1,03 (s,s,6)(1,1-dime); 1,98(s,3)(9-me);
 2,31(s,3)(13-me); 3,52(s,3)(5-methoxy);
 4,73(t,1)(4); 10,11(d,1)(15); die weiteren
 olefinischen Protonen wurden nicht zugeordnet

β 0,94(s,6)(1,1-dime); 2,03(s,3)(9-me); 2,61
 (s,3)(13-me); 3,61(s,3)(5-methoxy); 10,09(d,1)(15)

UV/Vis 384 nm (β), 358 nm (α)

MS M⁺ 300

5.11 Fermentation und Membranisolierung

Verwendete *Halobacterium halobium*-Stämme: S9 (Bacterio-opsin +, Halo-opsin +, Retinal +) und JW 5 (Bacterio-opsin +, Halo-opsin +, Retinal -)

Die Anzucht und Isolierung erfolgte nach (61). Der letzte Reinigungsschritt für die Isolierung von PM aus S9 besteht in einer Zuckerdichtegradientenzentrifugation (20 - 50 %), wobei PM aus einer scharfen Bande erhalten wird. Nach Dialyse gegen H₂O und zweimaligem Waschen mit H₂O (Zentrifugation 200000 g, 45 min) wird 320 µM PM bei - 20° aufbewahrt.

Ausbeuten: 3,3 - 4 g PM/100 l Kulturmedium

$A_{280}/A_{560} = 1,5 \text{ bis } 1,7$

Die Isolierung von WM aus JW 5 erfolgt wie bei PM aus S9 mit einer Veränderung: Anstelle des Zuckergradienten wird ein Zuckerstufengradient (25/45 %) verwendet und die Membranfraktion in 0,1 M NaCl aufgetragen. Nach Dialyse gegen H₂O und zweimaligem Waschen mit H₂O (Zentrifugation 200000 g, 90 min) wird 120 µM WM mit 0,01 % Natriumazid bei 4° C aufbewahrt.

Ausbeuten: 0,7 - 0,8 g WM/100 l Kulturmedium

A_{280}/A_{560} (nach Inkubation mit Retinal) = 2,4 bis 3,0

Die Molekulargewichte der isolierten Proben werden über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Gradient 9 - 24 %)

kontrolliert.

Zur Herstellung von Analog-BR während des Wachstums wurde an den Tagen zwei, drei und vier zu 700 ml Kulturen JW 5 je 200 nmol Retinalanalog in 1 ml Isopropanol zugegeben. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei S9.

5.12 Herstellung von Zellvesikeln

JW 5-Zellen aus einem 10 Liter Fermenter wurden nach Waschen mit 4 M NaCl in 200 ml 4 M NaCl aufgenommen und portionsweise bei 4⁰ mit der großen Spitze eines Branson sonifier-Gerätes in 10-Sekunden-Intervallen beschallt. Die Vesikelbildung erkennt man an der entstehenden hellgrauen Suspension mit geringerer Trübung. Ganze Zellen wurden durch Zentrifugation bei 15000 g (15 min) entfernt. Der Vesikelüberstand wurde bei 200000 g 45 min zentrifugiert. Nach Resuspension der Vesikel in 100 ml 4 M NaCl wurden beide Zentrifugationsschritte wiederholt und die Vesikel in 10 ml 4 M NaCl aufgenommen. Der Proteingehalt wurde nach Lowry bestimmt. Er beträgt 42 bis 52 mg/ml mit einem BR-Gehalt nach Inkubation mit Retinal von 6 bis 10 µg/mg Protein.

5.13 Apomembran

16 μM PM in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 und 0,2 M Hydroxylamin wurde mit Licht einer 900 W-Xenon-Lampe ($\lambda > 320 \text{ nm}$) bei 30°C belichtet. Nach fünf Stunden wurde keine Absorption bei 560 nm mehr beobachtet und die Retinaloximabsorption mit Maximum bei 360 nm nahm nicht mehr ab. Es wurde 2 h gegen das 20fache Volumen Wasser dialysiert und dann zweimal mit Wasser gewaschen. Retinal(oxim) blieb bis zu maximal 5 % in der Membran zurück und bildet mit BO wieder PM.

A_{280}/A_{560} (nach Inkubation mit Retinal) = 2,0 bis 2,2

5.14 Rekonstitution von Bacteriorhodopsin und Analog-Bacteriorhodopsin

Die Retinalanalog-Proben wurden vor Einsatz in die Reaktion auf Reinheit überprüft durch Absorptionsspektroskopie, HPLC oder Dünnschichtchromatographie und Carr-Price Anfärbung und bei Bedarf massenspektrometrisch.

8 - 16 μM Apomembran- oder Weiße Membran-Suspensionen in H_2O werden mit äquimolaren Mengen an 3 - 16 mM Retinal- oder Retinalanaloglösungen in Isopropanol versetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Der Isopropanolanteil der Inkubationsmischung darf dabei 5 % nicht übersteigen, da sonst Denaturierung des Proteins erfolgt. Ethanolische Lösungen können bis zu 10 % Endkonzentration verwendet

werden.

5.15 Messung der Protonentransportaktivität

100 μ l / 160 μ M BO Zellvesikel aus JW 5

2 - 5 μ l 3,2-8,0 mM Retinal bzw.

Retinalanalog in Isopropanol

10 μ l 100 mM Triphenylphosphoniumbromid (TPP)

in Ethanol

Zellvesikel wurden bei Raumtemperatur mit Retinal bzw. Retinalanalog bis zu 5 h im Dunkeln inkubiert (Blindwert mit Isopropanol), auf 1 ml mit 4 M NaCl verdünnt und die Rekonstitution über UV/Vis - Spektren kontrolliert. Nach weiterer Verdünnung mit 4 M NaCl (1 : 6) und Zugabe von TPP wurde die pH-Änderung bei Belichtung verfolgt und mit 10 mM HCl- und NaOH-Eichlösungen kalibriert.

Variation a): Die Zellvesikel wurden vor Inkubation portionsweise mit H_2O 1 : 1 verdünnt. Die Messung erfolgte in 2 M NaCl.

Variation b): Nach Zugabe des Retinalanalog wurde zusätzlich bis zu 5 min bei 370-460 nm belichtet.

Für die Messung der Protonentransportaktivität wurde mit einem Diaprojektor (150 W) über Kantenfilter belichtet, deren Durchlässigkeitsgrenze um 30 bis 50 nm bei kürzerer Wellenlänge lag als das jeweilige Absorptionsmaximum des Chromophors. Bei dieser Variation der Kantenfilter erhielt man für BR-Vesikel identische Resultate. Die Protonentrans-

portgeschwindigkeit wurde bei steigender Lichtintensität gemessen. Man erhielt eine Sättigungskurve. Der Vergleich mit BR erfolgte über Meßwerte aus dem linearen Bereich. Die Protonentransportaktivität von BR entspricht 100 %.

5.16 Deuteriertes Bacteriorhodopsin

PM oder Analog-BR wurden in D_2O suspendiert und mit Licht einer 900 W-Xenon-Lampe ($\lambda > 520$ nm) belichtet. Nach 30 min wurden die Membranen durch Zentrifugation bei 200000 g (30 min) sedimentiert. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Der Austausch des Wasserstoffs an der Schiffschen Base durch Deuterium wurde für PM und für 9,12-Phenylretinal-BR durch Resonanz-Raman Spektroskopie nachgewiesen.

5.17 BR-Trimer

32 μM Purpurmembran in 1 M NaCl-Lösung, die 10 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), pH 7, und 3 % n-Octyl- β -D-glucopyranosid (OG) enthielt, wurde drei Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Diese Probe wurde dann auf 1 % OG mit 10 mM MOPS pH 7 in 1 M NaCl verdünnt und in einer Amicon-Zelle eingeeengt auf eine Endkonzentration von 480 μM

(1 M NaCl, 10 mM MOPS, 1 % OG). Anschließend wurde 1 h lang bei 200000 g und 10° zentrifugiert, um restliche PM zu entfernen. BR-Trimere wurden in einer Konzentration von $320 \mu\text{M}$ (20 OD) erhalten.

5.18 BR-Monomer

$400 \mu\text{M}$ PM-Suspension in 10 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäurepuffer (HEPES), pH 6 oder pH 7, der 30 mg/ml Triton X 100 und 0.01 % Natriumazid enthielt, wurde zwei Tage lang bei 34°C gerührt. Nach Zentrifugation wie bei BR-Trimer wurde eine BR-Monomer Lösung mit etwa $320 \mu\text{M}$ BR erhalten.

5.19 13-Azidoretinal als Inhibitor in der Bacterio-opsin-Bindungsstelle

Jeweils 1 ml $16 \mu\text{M}$ WM - Proben wurden mit steigenden Konzentrationen (2 bis 20 nmol) Retinalanalog versetzt und 10 min lang bei 20°C inkubiert. Anschließend wurde mit 32 nmol all-trans-Retinal versetzt und die Geschwindigkeit der Absorptionzunahme bei 560 nm verfolgt.

5.20 Extraktionen der Bacteriorhodopsine

Die Extraktionsexperimente an BR- oder Analog-BR-Proben bzw. der Inkubationsmischung aus Retinalanalog und WM und zum Vergleich an WM-Proben wurden im Dunkeln oder bei Rotlicht durchgeführt.

1 ml 8 -16 μM BR-, Analog-BR und WM wurden bei 0°C mit 1 ml Isopropanol und 2 ml n-Hexan versetzt, am Vortex durchmischt und 2 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Hexanüberstand wurde entfernt, die wässrige Phase nochmals mit 1 ml n-Hexan extrahiert und die vereinigten Hexanphasen über eine Na_2SO_4 -Säule (Pasteurpipette) getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde in 50 μl Elutionsmittel für die HPLC aufgenommen und durch HPLC analysiert. 2 - 3 nmol Retinal konnten detektiert werden. Die Zuordnung der Isomere erfolgte über Vergleichschromatogramme.

Anmerkung: Bei der HPLC eluierte all-trans-13-dm-11,12-Didehydroretinal 35 gemeinsam mit dem 9-cis-Isomer, während 13-cis-35 mit 9,13-dicis-35 eluierte. Die all-trans-Probe enthielt 58% 9-cis-, die 13-cis-Probe 50% 9,13-dicis-Isomer. Da jedoch keine Bacteriorhodopsinbildung mit 9-cis-Isomeren bekannt ist, konnten die HPLC-Chromatogramme der Extraktionslösungen aus 13-cis-35-BR so interpretiert werden, daß das Entstehen eines all-trans-Signals auf die Isomerisierung von 13-cis nach all-trans zurückzuführen war.

5.21 Proben für Röntgenbeugungsexperimente

1 mg (38,5 nmol) PM bzw. Analog-BR wurde zweimal mit 0,15 M Kaliumphosphatpuffer, pH 5,2, gewaschen, in 500 μ l des Puffers aufgenommen und 35 min bei 200000 g zentrifugiert.

5.22 Membranvergrößerung

250 μ l 120 μ M PM in 0,15 M Kaliumphosphatpuffer pH 5,2 wurden mit 5 - 2,5 μ l 10 % n-Octyl- β -D-glucopyranosid (OG), 2 - 4 μ l 10 mM Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und 5 μ l 10 % NaN_3 versetzt. Die Proben wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und ein bis zweimal täglich leicht geschüttelt. Die Membranvergrößerung wurde nach mehreren Tagen im Elektronemikroskop kontrolliert. Beste Vergrößerungsergebnisse wurden mit 0,1 μ M BR in 0,08 μ M CTAB und 0,2 % OG erzielt.

Literatur

- 1 Gärtner, W., Towner, P., Hopf, H., Oesterhelt, D.
Biochemistry 22 (1983) 2637-2644
Removal of methyl groups from retinal controls the activity of bacteriorhodopsin
- 2 Towner, P., Gärtner, W., Walckhoff, B., Oesterhelt, D., Hopf, H.
Eur. J. Biochem. 117 (1981) 353-359
Regeneration of rhodopsin and bacteriorhodopsin. The role of retinal analogues as inhibitors
- 3 Gärtner, W., Oesterhelt, D., Seifert-Schiller, E., Towner, P., Hopf, H., Böhm, I.
J. Am. Chem. Soc. 106 (1984) 5654-5659
Acetylenic retinals form functional bacteriorhodopsins but do not form bovine rhodopsins
- 4 Nuss, M.C., Zinth, W., Kaiser, W., Kölling, E., Oesterhelt, D.
Chemical Physics Letters 117 (1985) 1-7
Femtosecond spectroscopy of the first events of the photochemical cycle in bacteriorhodopsin
- 5 Polland, H.-J., Franz, M.A., Zinth, W., Kaiser, W., Kölling, E., Oesterhelt, D.
Biophys. J. 49 (1986) 651-662
Early picosecond events in the photocycle of bacteriorhodopsin
- 6 Steiner, M., Oesterhelt, D.
EMBO J. 2 (1983) 1379-1385
Isolation and properties of the native chromoprotein halorhodopsin

- 7 Ogurusu,T., Maeda,A., Yoshizawa,T.
J. Biochem. 95 (1984) 1073-1082
 Absorption spectral properties of purified
 halorhodopsin

- 8 Taylor,M.E., Bogomolni,R.A., Weber,H.J.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80 (1983) 6172-6176
 Purification of photochemically active halorhodopsin

- 9 Sugiyama,Y., Mukohata,Y.
J. Biochem. 96 (1984) 413-420
 Isolation and charakterisation of halorhodopsin from
Halobacterium halobium

- 10 Oesterhelt,D.
Angew. Chem. 88 (1976) 16-24
 Bacteriorhodopsin als Beispiel einer lichtgetriebenen
 Protonenpumpe

- 11 Oesterhelt,D., Stoeckenius,W.
Nature New Biol. 233 (1971) 149-152
 Rhodosin-like protein from the purple mambrane of
Halobacterium halobium

- Lanyi,J.K.
New comprehensive biochemistry, L. Ernster (ed.)
Elsevier/North Holland, Amsterdam (1984) 315-350
 Bacteriorhodopsin and related light-energy converters

- 12 Bamberg,E., Hegemann,P., Oesterhelt,D.
Biochemistry 23 (1984) 6216-6221
 The chromoprotein of halorhodopsin is the light-driven
 electrogenic pump in *Halobacterium halobium*

- 13 Lemke,H.L., Oesterhelt,D.
Eur. J. Biochem. 115 (1981) 595-604
 The role of tyrosine residues in the function of
 bacteriorhodopsin. Specific nitration of tyrosine 26

- 14 Vogelsang-Wenke, H.
Dissertation Universität München 1986
Zur Molekularbiologie von Retinalproteinen aus
Halobacterium halobium
- 15 Khorana, H.G.
Annals of the New York Academy of Sciences (1986)
272-288
Rhodopsin, the visual pigment, and bacteriorhodopsin
- 16 Hegemann, P., Blanck, A., Vogelsang-Wenke, H.,
Lottspeich, F. Oesterhelt, D.
EMBO J. 6 (1987) 259-264
The halo-opsin gene. I. Identification and isolation
- 17 Lanyi, J.K.
Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 15 (1986) 11-28
Halorhodopsin: A light-driven chloride pump
- 18 Blanck, A., Oesterhelt, D.
EMBO J. 6 (1987) 265-273
The halo-opsin gene. II. Sequence, primary structure of
halorhodopsin and comparison with bacteriorhodopsin
- 19 Balogh-Nair, V., Nakanishi, K.,
Meth. Enz. 88 (1982) 496-506
Synthetic analogs of retinal, bacteriorhodopsin, and
bovine rhodopsin
- 20 Towner, P., Gärtner, W., Walckhoff, B., Oesterhelt, D.,
Hopf, H.
FEBS Letters 117 (1980) 363-367
 α -Retinal as a prosthetic group in bacteriorhodopsin

- 21 Gärtner, W., Oesterhelt, D., Towner, P., Hopf, H., Ernst, L.
J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 7642-7643
13-(Trifluoromethyl)retinal forms an active and
far-red-shifted chromophore in bacteriorhodopsin
- 22 Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.G., Testlin, V.J.,
Zakis, V.J.
Bioorg. Chem. USSR 6 (1980) 1427-1429
- 23 Bayley, H., Huang, K.-S., Radhakrishnan, R., Ross, A.H.,
Takagaki, Y., Khorana, H.G.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 2225-2229
Site of attachment of retinal in bacteriorhodopsin
- 24 Mullen, E., Johnson, A.H., Akhtar, M.
FEBS Letters (1981) 187-193
The identification of Lys-216 as the retinal binding
residue in bacteriorhodopsin
- 25 Lemke, H.-D., Oesterhelt, D.
FEBS Letters 128 (1981) 255-260
Lysine 216 is a binding site of the retinyl moiety in
bacteriorhodopsin
- 26 Dencher, N.A., Rafferty, C.N., Sperling, W.
Jül-1374, Kernforschungsanlage Jülich, Dezember 1976
13-cis and trans Bacteriorhodopsin: Photochemistry and
dark equilibrium
- 27 Harbison, G.S., Smith, S.O., Pardo, J.A., Winkel, C.,
Lugtenburg, J., Herzfeld, J., Mathies, R., Griffin, R.G.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 1706-1709
Dark-adapted bacteriorhodopsin contains 13-cis, 15-syn
and all-trans, 15-anti retinal Schiff bases

- 28 Lozier, R.H., Bogomolni, R.A., Stoeckenius, W.
Biophysical J. 15 (1975) 955-962
Bacteriorhodopsin: A light-driven proton pump in
Halobacterium halobium
- 29 Kalisky, O., Ottolenghi, M.
Photochem. Photobiol. 35 (1982) 109-115
Branching pathways in the photocycle of
bacteriorhodopsin
- 30 Kobayashi, T., Ohtani, H., Iwai, J., Ikegami, A., Uchiki, H.
FEBS 162 (1983) 197-200
Effect of pH on the photoreaction cycles of
bacteriorhodopsin
- 31 Parodi, L.A., Lozier, R.H., Bhattacharjee, S.M.,
Nagle, J.F.
Photochem. Photobiol. 40 (1984) 501-512
Testing kinetic models for the bacteriorhodopsin
photocycle-II. Inclusion of an O to M backreaction
- 32 Beach, J.M., Fager, R.S.
Photochem. Photobiol. 41 (1985) 557-562
Evidence for branching in the photocycle of
bacteriorhodopsin and concentration changes of late
intermediate forms
- 33 Renard, M., Delmelle, M.
Eur. Biophys. J. 12 (1985) 223-228
pH and salt effects on the slow intermediates of the
bacteriorhodopsin photocycle. A flash photolysis study
- 34 Albeck, A., Friedman, N., Sheves, M., Ottolenghi, M.
J. Am. Chem. Soc. 108 (1986) 4614-4618
The role of retinal isomerisations and rotations in the
photocycle of bacteriorhodopsin

- 35 Tavan,P., Schulten,K., Oesterhelt,D.
Biophys. J. 47 (1985) 415-430
The effect of protonation and electrical interactions
on the stereochemistry of retinal Schiff bases
- 36 Schulten,K, Schulten,Z., Tavan,P.
Inf. and Energy Transduction in Biological Membranes,
Alan R. (ed.) (1984)
An isomerisation model for the pump cycle of
bacteriorhodopsin
- 37 Schreckenbach,T., Walckhoff,B., Oesterhelt,D.
Eur. J. Biochem. 76 (1977) 499-511
Studies on the retinal-protein interaction in
bacteriorhodopsin
- 38 van der Steen,R., Biesheuvel,P.L., Mathies,R.A.,
Lugtenburg,J.
J.Am.Chem.Soc 108 (1986) 6410-6411
Retinal analogues with locked 6-7 conformations show
that bacteriorhodopsin requires the 6-s-trans
conformation in the chromophore
- 39 Honig,B., Dinur,U., Nakanishi,K., Balogh-Nair,V.,
Gawinowicz,M.A., Arnaboldi,M., Motto,M.G.
J. Am. Chem. Soc. 101 (1979) 7084-7086
An external point-charge model for wavelength
regulation in visual pigments
- 40 Nakanishi,K., Balogh-Nair,V., Arnaboldi,M.,
Tsujimoto,K., Honig,B.
J. Am. Chem. Soc. 102 (1980) 7945-7947
An external point-charge model for bacteriorhodopsin to
account for its purple colour

- 41 Blatz, P.E., Mohler, J.H., Navangul, H.V.
Biochemistry 11 (1972) 848-855
Anion-induced wavelength regulation of absorption
maxima of Schiff bases of retinal
- 42 Blatz, P.E., Mohler, J.H.
Biochemistry 11 (1972) 3240-3243
Effect of selected hydrogen-bonding solvents on the
absorption maxima of N-retinylidene-n-butylammonium
salts
- 43 Kakitani, H., Kakitani, T., Rodman, H., Honig, B.,
Callender, R.
J. Phys. Chem. 87 (1983) 3620-3628
Correlation of vibrational frequencies with absorption
maxima in polyenes, rhodopsin, bacteriorhodopsin, and
retinal analogs
- 44 Fischer, U.C., Oesterhelt, D.
Biophysical J. 31 (1980) 139-145
Changes in the protonation state of bacterio-opsin
during reconstitution of bacteriorhodopsin
- 45 Blatz, P.E., Liebman, P.A.
Exp. Eye Res. 17 (1973) 573-580
Wavelength regulation in visual pigments
- 46 Honig, B., Greenberg, A.D., Dinur, U., Ebrey, T.G.
Biochemistry 15 (1976) 4593-4599
Visual-pigment spectra: Implications of the protonation
of the retinal Schiff base
- 47 Mayer, H., Isler, O.
Carotenoids, Isler, O. (ed.), Birkhäuser Verlag 1971
VI. Total synthesis

- 48 Cadogan, J.I.G. (ed.)
Academic Press 1979
Organophosphorous reagents in organic synthesis
- 49 Frickel, F.
The retinoids, Vol.1, Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S. (eds.), Academic Press 1984
2. Chemistry and physical properties of retinoids
- 50 Kölling, E., Gärtner, W., Oesterhelt, D., Ernst, L.
Angew. Chem. int. ed. engl. 23 (1984) 81-82
Sterically fixed retinal-analogue prevents
proton-pumping activity in bacteriorhodopsin
- 51 IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature
Europ. J. Biochem. 129 (1982) 1-5
Nomenclature of retinoids
- 52 Quinkert, M., Hintzmann, M., Michaelis, P., Jürges, P., Appelt, H., Krüger, U.
Justus Liebigs Ann. Chem. 784 (1971) 38
- 53 Hopf, H., Krause, N.
Tetrahedron Letters 26 (1985) 3323-3326
Retinoide-V. Synthese acetylenischer Retinoide durch
Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung
- 54 Ernst, L., Hopf, H., Krause, N.
J. Org. Chem. 52 (1987) 398-405
Retinoids. 6. Preparation of alkyl- and
trimethylsilyl-substituted retinoids via conjugate
addition of cuprates to acetylenic esters

- 55 Wohl, R.A.
Synthesis (1974) 38-40
A convenient one-step procedure for the synthesis of cyclic enol ethers. The preparation of 1-methoxy-1-cycloalkenes
- 56 Corey, E.J., Schmidt, G.
Tet. Lett. 5 (1979) 399-402
Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media
- 57 Kölling, E.
Diplomarbeit, Braunschweig 1982
Zur Synthese von Ringmodifizierten Retinalanalogen: 5-Desmethyl-5-methoxy-ionylidencarbonsäuremethylester
- 58 Oesterhelt, D., Schuhmann, L.
FEBS Letters 44 (1974) 262-265
Reconstitution of bacteriorhodopsin
- 59 Oesterhelt, D., Schuhmann, L., Gruber, H.
FEBS Letters 44 (1974) 257-261
Light-dependent reaction of bacteriorhodopsin with hydroxylamine in cell suspensions of *Halobacterium halobium*: Demonstration of an apo-membrane
- 60 Schreckenbach, T., Oesterhelt, D.
Federation proceedings 36 (1977) 1810-1814
Photochemical and chemical studies on the chromophore of bacteriorhodopsin
- 61 Oesterhelt, D., Stoeckenius, W.
Meth. Enzym. 31 (1974) 667-678
Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane

- 62 Sumper, M., Herrmann, G.
FEBS Letters 69 (1976) 149-152
Iogenesis of purple membrane: Regulation of
bacterio-opsin synthesis
- 63 Sumper, M., Herrmann, G.
Eur. J. Biochem. 89 (1978) 229-235
Studies on the biosynthesis of bacterio-opsin
- 64 Sumper, M., Reitmeier, H., Oesterhelt, D.
Angew. Chem. 88 (1976) 203-210
Zur Biosynthese der Purpirmembran von Halobakterien
- 65 Oesterhelt, D.
Meth. Enzym. 88 (1982) 10-17
Reconstitution of the retinal proteins
bacteriorhodopsin and halorhodopsin
- 66 Rao, V.J., Zingoni, J.P., Crouch, R., Denny, M., Liu, R.S.H.
Photochem. Photobiol. 41 (1985) 171-174
Isomers of 3,7,11-trimethyldodeca-2,4,6,8,10-pentaenal
(A linear analogue of retinal) and lower homologues in
their interaction with bovine opsin and bacterioopsin
- 67 Oesterhelt, D.
persönliche Mitteilung
- 68 Kakitani, T., Kakitani, H., Honig, B., Nakanishi, K.
J. Am. Chem. Soc. 105 (1983) 648-650
Symmetric charge distribution in the bacteriorhodopsin
binding site

- 69 Mao,B., Govindjee,R., Ebrey,T.G., Arnaboldi,M.,
Balogh-Nair,V., Nakanishi,K., Crouch,R.
Biochemistry 20 (1981) 428-435
Photochemical and functional properties of
bacteriorhodopsins formed from 5,6-dihydro- and
5,6-dihydrodesmethylretinals
- 70 Muradin-Szweykowska,M., van Amsterdam,L.J.P.,
Rodenburg,L.J.M., Lugtenburg,J., van der Bend,R.L.,
van Dam,K.
FEBS Letters 154 (1983) 180-184
(5-demethyl)-Bacteriorhodopsin analogue: Its formation
and light-driven proton pump action
- 71 Sheves,M., Friedman,N., Rosenbach,V., Ottolenghi,M.
FEBS 166 (1984) 245-247
Preparation of (1,1,5-tri-demethyl)bacteriorhodopsin
pigment and its photocycle study
- 72 Bartels,K., Hopf,H.
Angew. Chem. 96 (1984) 225-226
Herstellung von Spiroretinal und verwandten Retinoiden
- 73 Jäger,H.
Dissertation, Universität Braunschweig 1986
- 74 N. Krause
Dissertation, Universität Braunschweig 1986
Sterisch und elektronisch modifizierte Retinoide
- 75 Bartels,K.
Dissertation, Universität Braunschweig 1984
Synthese von Spiroretinal und verwandten Retinoiden

- 76 Henderson, R., Unwin, P.N.T.
Nature 257 (1975) 28-32
Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy
- 77 Blaurock, A.E., Stoekenius, W.
Nature New Biol. 233 (1971) 152-154
Structure of the purple membrane
- 78 Henderson, R.
J. Mol. Biol. 93 (1975) 123-138
The structure of purple membrane from *Halobacterium halobium*: Analysis of the X-ray diffraction pattern
- 79 Kriebel, A.N., Albrecht, A.C.
Journal Chem. Phys. 65 (1976) 4575-4583
Excitonic interaction among three chromophores: An application to the purple membrane of *Halobacterium halobium*
- 80 Ebrey, T.G., Becher, B., Mao, B., Kilbride, P.
J. Mol. Biol. 112 (1977) 377-397
Exciton interactions and chromophore orientation in the purple membrane
- 81 Heyn, M.P., Cherry, R.J., Müller, U.
J. Mol. Biol. 117 (1977) 607-620
Transient and linear dichroism studies on bacteriorhodopsin: Determination of the orientation of the 568 nm all-trans retinal chromophore
- 82 Unwin, P.T.N., Henderson, R.
J. Mol. Biol. 94 (1975) 425-440
Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens

- 83 Unwin, P.N.T., Henderson, R.
33rd Ann. Proc. Electron Microscopy Soc. Amer. Las Vegas, Nevada, G.W.Bailey (ed.) (1975) 298-299
High resolution structure determination of unstained biological molecules
- 84 Unwin, N., Henderson, R.
Science (1984) 56-66
The structure of proteins in biological membranes
- 85 Henderson, R., Baldwin, J.M., Downing, K.H., Lepault, J., Zemlin, F.
Ultramicroscopy 19 (1986) 147-178
Structure of purple membrane from Halobacterium halobium: Recording, measurement and evaluation of electron micrographs at 3.4 Å resolution
- 86 Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.G., Feigina, M.Y., Kiselev, A.V., Lobanov, N.A., Nasimov, I.V.
Bioorg. Chem. 4 (1978) 1573-1574
The amino acid sequence of bacteriorhodopsin
- 87 Khorana, H.G., Gerber, G.E., Herlihy, W.C., Gray, C.P., Anderegg, R.J., Nihei, K., Biemann, K.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 5045-5050
Amino acid sequence of bacteriorhodopsin
- 88 Trewheella, J., Anderson, S., Fox, R., Gogol, E., Khan, S., Engelman, D. Zaccai, G.
Biophys. J. 42 (1983) 233-241
Assignment of segments of the bacteriorhodopsin sequence to positions in the structural map
- 89 Lemke, H.-D.
Dissertation, Universität München 1982
Proteinchemische Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Protonenpumpe Bacteriorhodopsin

- 90 King, G.I., Mowery, P.C., Stoeckenius, W., Crespi, H.L., Schoenborn, B.P.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4726-4730
Location of the chromophore in bacteriorhodopsin
- 91 Jubb, J.S., Worcester, D.L., Crespi, H.L., Zaccai, G.
EMBO J. 7 (1984) 1455-1461
Retinal location in purple membrane of *Halobacterium halobium*: A Neutron diffraction study of membranes labelled in vivo with deuterated retinal
- 92 Seiff, F., Wallat, I., Ermann, P., Heyn, M.P.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 3227-3231
A neutron diffraction study on the location of the polyene chain of retinal in bacteriorhodopsin
- 93 Huang, K.-S., Radhakrishnan, Bayley, H., Khorana, G.H.
J. Biological Chem.
Orientation of retinal in bacteriorhodopsin as studied by cross-linking using a photosensitive analog of retinal
- 94 Rossmann, M.G., Henderson, R.
Acta Cryst. A 38 (1982) 13-20
Phasing electron diffraction amplitudes with the molecular replacement method
- 95 Tu, A.T
Raman spectroscopy in biology, Wiley, New York, 1982
Visual pigments and bacteriorhodopsin
- 96 Mendelsohn, R.
Nature 243 (1976) 22
Resonance Raman spectroscopy of the photoreceptor-like pigment of *Halobacterium halobium*

- 97 Aton,B., Doukas,A.G., Callender,R.H., Becher,B.,
Ebrey,T.G.
Biochemistry 16 (1977) 2995-2999
Resonance Raman studies of purple membrane

- 98 Lewis,A., Spoonhower,J., Bogomolni,R.A., Lozier,R.H.,
Stoeckenius,W.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 11 (1974) 4462
Tunable laser Resonance Raman spectroscopy of
bacteriorhodopsin

- 99 Stockburger,M., Alshut,T.
unveröffentlicht

- 100 Polland,H.-J., Franz,M.A., Zinth,W., Kaiser,W.,
Kölling,E., Oesterhelt,D.
Biochim. Biophys. Acta 767 (1984) 635-639
Optical picosecond studies of bacteriorhodopsin
containing a sterically fixed retinal

- 101 Fendler,K., Gaertner,W., Oesterhelt,D., Bamberg,E.
subm. to Biochim. Biophys. Acta 1986
Electrogenic transport properties of bacteriorhodopsin
containing chemically modified retinal analogues

- 102 Casadio,R., Gutowitz,H., Mowery,P., Taylor,M.,
Stoeckenius,W.
Biochim. Biophys. Acta 590 (1980) 13-23
Light-dark adaptation of bacteriorhodopsin on
triton-treated purple membrane

- 103 Matthew,J.B., Grud,F.R.N.
Meth. Enzym. 130 (1986) 437-453
Stabilization and destabilization of protein structure
by charge interactions

- 104 Spudich,J.L., McCain,D.A., Nakanishi,K., Okabe,M.,
Shimizu,N., Rodman,H., Honig,B., Bogomolni,R.A.
Biophys. J. 49 (1986) 479-483
Chromophore/protein interaction in bacterial sensory
rhodopsin and bacteriorhodopsin

Abkürzungen

AM	Apomembran
BO	Bacterio-opsin
BR	Bacteriorhodopsin
BR _c	13- <u>cis</u> -Retinal enthaltendes BR
BR _t	all- <u>trans</u> -Retinal enthaltendes BR
Bu	Butyl
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DIBAH	Diisobutylaluminiumhydrid
dm	Desmethyl
<i>H.</i>	<i>Halobacterium</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OG	n-Octyl- β -D-glucopyranosid
PM	Purpurmembran
SB	Schiffsche Base
SBH ⁺	protonierte Schiffsche Base
WM	Weiße Membran

DANKSAGUNGEN

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Leitung von Prof. Dr. D. Oesterhelt durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Oesterhelt sehr für seine Anregungen und sein Interesse sowie die großzügige Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Hopf und seinen Mitarbeitern danke ich für die gute Zusammenarbeit und für die Überlassung von Retinalanaloga.

Herr Dr. R. Henderson ermöglichte mir einen vierwöchigen Forschungsaufenthalt in seinem Labor am Medical Research Council (MRC) in Cambridge. Dieser wurde durch die European Molecular Biology Organisation (EMBO) finanziert.

Für die Interpretation von Massenspektren danke ich Herrn Prof. Dr. W. Schäfer.

Frau Elke Seifert-Schiller danke ich besonders für ihre technische Hilfe.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützte diese Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereiches SFB 143.

LEBENS LAUF

persönliche Daten:	geboren in Sende, jetzt Verl am	27. 9. 1956
	verheiratet seit	10.10. 1979
	Eltern: Heinrich Clasbrummel, Architekt Anni Clasbrummel, geb. Meyer	
Schulbildung:	Grundschule Sende-Ebbinghaus	1963 - 1966
	Realschule Verl	1966 - 1969
	Gymnasium Bethel	1969 - 1975
	Abitur	5. 6. 1975
Berufsausbildung:	Heinrich-Lanz-Schule II, Mannheim	1975 - 1977
	staatliche Prüfung für	
	Chemisch-Technische-Assistenten	14. 6. 1977
	Studium der Chemie, TU Braunschweig	10.77-10.82
	Diplom-Vorprüfung	21.12. 1979
	Diplomprüfung	1.11. 1982
Dissertation:	Max-Planck-Institut für Biochemie,	12.82- 3.87
	Martinsried bei München	

